

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 991**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2005 E 05817542 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1817048**

54 Título: **Formulaciones estables de péptidos insulínótropicos**

30 Prioridad:

12.11.2004 DK 200401753
08.12.2004 DK 200401906
13.05.2005 EP 05104050
18.05.2005 EP 05104172
11.11.2005 WO PCT/EP2005/055916

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2014

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsvård, DK

72 Inventor/es:

LUDVIGSEN, SVEND;
SCHLEIN, MORTEN;
BØVING, TINE ELISABETH GOTTSCHALK;
BONDE, CLAUDE;
LILLEØRE, ANNE-METTE;
ENGELUND, DORTHE KOT y
NIELSEN, BJARNE RØNFELDT

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 458 991 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones estables de péptidos insulínótropicos

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas. Más específicamente la invención pertenece a formulaciones farmacéuticas estables en almacenamiento que comprenden un péptido insulínótropico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0002] Los péptidos terapéuticos se usan ampliamente en la práctica médica. Se requiere que las composiciones farmacéuticas de los péptidos terapéuticos tengan una vida en almacenamiento de varios años con el propósito de ser apropiados para uso común. Sin embargo, las composiciones de péptido son inherentemente inestables debido a sensibilidad hacia degradación física y química. La degradación química involucra cambios de enlaces covalentes, tales como oxidación, hidrólisis, racemización o reticulación. La degradación física involucra cambios conformacionales relativos a la estructura nativa del péptido, lo cual puede llevar a agregación, precipitación o adsorción a superficies.

15 [0003] El glucagón se ha usado durante décadas en prácticas médicas dentro de diabetes y varios péptidos similares a glucagón se han desarrollado para varias indicaciones terapéuticas. El gen de preproglucagón codifica glucagón así como péptido 1 similar a glucagón (GLP-1) y péptido 2 similar a glucagón (GLP-2). Los análogos y derivados de GLP-1 así como el péptido homólogo de lagarto, exendina 4, se están desarrollando para el tratamiento de hiperglicemia dentro de la diabetes tipo 2. Los GLP-2 son potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Sin embargo, todos estos péptidos que abarcan 29-39 aminoácidos tienen un grado alto de homología y comparten un número de propiedades, notablemente su tendencia para agregar y para la formación de fibrillas insolubles. Esta propiedad parece que abarca una transmisión de una conformación de hélice alfa predominante a hojas beta (Blundell T.L. (1983) The conformation of glucagon. In: Lefebvre P.J. (Ed) Glucagon I. Springer Verlag, pp 37-55, Senderoff R.I. y colaboradores, J. Pharm. Sci. 87 (1998)183- 189, WO 01/55213). La acumulación de los péptidos similares a glucagón principalmente se ve cuando las soluciones de los péptidos se agitan o mezclan, en la interfase entre la solución y la fase de gas (aire), y en contacto con superficies hidrofóbicas tales como Teflón®.

20 WO 01/77141 describe el tratamiento térmico de Arg³⁴-GLP-1 (7-37) a temperaturas elevadas por menos que 30 segundos. WO 04/55213 describe microfiltración de Arg³⁴-GLP-1 (7-37) a pH 9.5. WO 01/55213 describe el tratamiento de Val⁸-GLP-1 (7-37) a pH de 12.3 por 10 minutos a temperatura ambiente. EO 03/35099 describe la preparación de cristales de zinc de GLP-1 a pH alcalino.

25 [0004] Así, varios tratamientos y la adición de excipientes a menudo se debe aplicar a composiciones farmacéuticas de los péptidos similares a glucagón con el propósito de mejorar su estabilidad. La vida en almacenamiento de las formulaciones parenterales líquidas de estos péptidos debe ser por lo menos de un año, preferiblemente mayores. El período de uso cuando el producto se puede transportar y agitar diariamente a temperatura ambiente preferiblemente debe ser de varias semanas. Así, existe una necesidad de composiciones farmacéuticas de péptidos similares a glucagón las cuales han mejorado la estabilidad.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0005]

40 Figura 1. Curso en el tiempo de la formación de fibrilo.

Figura 2. Estabilidad física de liraglutida preparada por tratamiento de calor a 60 °C.

Figura 3. Pureza de liraglutida después del tratamiento de calor a 60 °C.

Figura 4. Estabilidad física de liraglutida preparada por tratamiento de calor a 80 °C.

Figura 5. Pureza de liraglutida después del tratamiento de calor a 80 °C.

45 Figura 6. Estabilidad física de liraglutida preparada por 15 min. de tratamiento de calor a 22, 40, 60 y 80 °C.

Figura 7. Estabilidad física de liraglutida preparada por tratamiento de calor a 50 y 80 °C a pH 10.

Figura 8. Pureza de liraglutida después del tratamiento de calor a 50 y 80 °C a pH 10.

Figura 9. Estabilidad física de liraglutida preparada por tratamiento de calor a 60 y 80 °C a pH 9 y 10.

Figura 10. Estabilidad física de liraglutida después de tratamiento de calor a 50-70 °C durante 60-120 minutos.

Figura 11. Penfill ® tratado con calor a diferentes tiempos y temperaturas que fueron sometidos posteriormente a rotación.

[0006] Lo siguiente es una definición detallada de los términos usados en la especificación.

5 [0007] El término “cantidad efectiva” como se usa en la presente significa una dosis que es suficiente con el propósito de que el tratamiento del paciente sea efectivo comparado con ausencia de tratamiento.

[0008] El término “medicamento” como se usa en la presente significa una composición farmacéutica apropiada para administración del compuesto farmacéuticamente activo a un paciente.

10 [0009] El término “composición farmacéutica” como se usa en la presente significa un producto que comprende un compuesto activo o una sal de este junto con excipientes farmacéuticos tales como solución amortiguadora, conservante y modificadores de tonicidad, la composición farmacéutica es útil para tratamiento, prevención o reducción de la severidad de una enfermedad o trastorno por administración de la composición farmacéutica a una persona. Así una composición farmacéutica también se conoce en la técnica como una formulación farmacéutica. Se debe entender que el pH de una composición farmacéutica la cual debe ser reconstituida es el valor de pH el cual se mide en la composición reconstituida producida por reconstitución en el líquido de reconstitución prescrito a temperatura ambiente.

20 [0010] El término “composición farmacéutica estable en almacenamiento” como se usa en la presente significa una composición farmacéutica la cual es estable por lo menos el período el cual se requiere por los medios reguladores en conexión con las proteínas terapéuticas. Preferiblemente, una composición farmacéutica estable en almacenamiento es estable por al menos un año a 5 °C. La estabilidad incluye estabilidad química además de estabilidad física.

[0011] El término “solución estable” como se usa en la presente significa una preparación de un compuesto el cual se usa como intermedio en la preparación de composición farmacéutica estables en almacenamiento como se describen anteriormente.

25 [0012] El término “farmacéuticamente aceptable” como se usa en la presente significa apropiado para aplicaciones farmacéuticas normales, esto es que da origen a eventos no adversos en pacientes, etc.

[0013] El término “solución amortiguadora” como se usa en la presente se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que reduce la tendencia del pH de la composición a cambiar con el tiempo como podría ocurrir de otra manera debido a reacciones químicas. Las soluciones amortiguadoras incluyen químicos tales como fosfato de sodio, TRIS, glicina y citrato de sodio.

30 [0014] El término “conservante” como se usa en la presente se refiere a un compuesto químico el cual se agrega a una composición farmacéutica para prevenir o retardar la actividad microbiana (crecimiento y metabolismo). Ejemplos de conservantes farmacéuticamente aceptables son el fenol, m-cresol y una mezcla de fenol y m-cresol.

35 [0015] El término “agente de isotonicidad” como se usa en la presente se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que sirve para modificar la presión osmótica de la composición farmacéutica tal que la presión osmótica se vuelve más cercana a aquella del plasma humano. Los agentes de isotonicidad incluyen NaCl, glicerol, manitol, etc.

40 [0016] El término “estabilizador” como se usa en la presente se refiere a químicos agregados a péptidos que contienen composiciones farmacéuticas con el propósito de estabilizar el péptido, esto es para aumentar la vida en almacenamiento y/o tiempo de uso de las composiciones. Ejemplos de estabilizadores usados en formulaciones farmacéuticas son L-glicina, L-histidina, arginina, polietilenglicol, y carboximetilcelulosa.

45 [0017] El término “agente tensoactivo” como se usa en la presente se refiere a cualquier molécula o ión que esté comprendido de una parte soluble en agua (hidrofílica), la cabeza, y un segmento soluble en grasa (lipofílica). Los agentes tensoactivos se acumulan preferiblemente en interfases, la cual la parte hidrofílica se orienta hacia el agua (fase hidrofílica) y la parte lipofílica hacia el aceite o fase hidrofóbica (esto es cristal, agua, aceite, etc.). La concentración en la cual los agentes tensoactivos comienzan a formar micelas se conoce como la concentración de micela crítica o CMC. Además, los agentes tensoactivos disminuyen la tensión superficial de un líquido. Los agentes tensoactivos también se conocen como compuestos anfipáticos. El término “detergente” es un sinónimo usado para agentes tensoactivos en general.

50 [0018] Los agentes tensoactivos **aniónicos** se pueden seleccionar del grupo de: ácido quenodesoxicólico, sal de sodio de ácido quenodesoxicólico, ácido cólico, ácido deshídrocólico, ácido desoxicólico, éster metílico de ácido deoxicólico, digitonin, Digitoxigenin, N,N-Dimetildodecilamina N-óxido, docusato sódico, ácido glicoquenodesoxicólico sódico, ácido glicocólico hidrato, ácido glicodesoxicólico monohidrato, sal de sodio de ácido glicodesoxicólico, sal de sodio de ácido glicodesoxicólico, sal de disodio de 3-sulfato de ácido glicolítico, éster etílico de ácido glicolítico, sal sódica de N-Lauroilsarcosina, sal sódica de N-Lauroilsarcosina, N-Lauroilsarcosina, N-Lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, Lugol, sal de sodio de ácido 1 -octanosulfónico, sal de

sodio de ácido 1-Octanosulfónico, Sodio 1-butanosulfonato, Sodio 1-decanosulfonato, Sodio 1-dodecanosulfonato, 1-heptanosulfonato sódico, 1-heptanosulfonato sódico, 1-nonanosulfonato sódico, 1-propanosulfonato sódico monohidrato, 2-bromoetansulfonato sódico, colato sódico hidrato, bilis de buey u oveja, colato sódico hidrato, coleato de sodio, desoxicolato de sodio, dodecil sulfato sódico, dodecil sulfato sódico, hexanosulfonato de sodio, octil sulfato de sodio, pentanosulfonato de sodio, taurocolato de sodio, sal de sodio de ácido tauroquenodesoxicólico, sal sódica de ácido taurodesoxicólico monohidrato, sal de disodio de 3-sulfato de ácido taurolicólico, sal de sodio de ácido tauroursodesoxicólico, sulfato de dodecil Trizma[®], DSS (docusato sódico, n.º de registro CAS [577-1 1 -7]), docusato de calcio, n.º de registro CAS [128-49-4]), docusato de potasio, n.º de registro CAS [7491 - 09-0]), SDS (dodecilsulfato sódico o laurilsulfato sódico), Dodecilfosfocolina (FOS-Colina-12), Decilfosfocolina (FOS-Colina-10), Nonilfosfocolina (FOS-Colina-9), ácido dipalmitoil fosfatídico, caprilato de sodio, y/o ácido ursodesoxicólico.

[0019] Los agentes tensoactivos **catiónicos** se pueden seleccionar del grupo de: bromuro de alquiltrimetilamonio, cloruro de Benzalconio, cloruro de Benzalconio, cloruro de Bencildimetilhexadecilamonio, cloruro de Bencildimetiltetradecilamonio, tetracloriodato de Benciltrimetilamonio, bromuro de Dimetildioctadecilamonio, bromuro de dodeciletildimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de etilhexadecildimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, Polioxietileno(10)-N-sebo-1,3-diaminopropano, bromuro de tonzonio, y/o bromuro de trimetil(tetradecil)amonio.

[0020] Los agentes tensoactivos **no iónicos** se pueden seleccionar del grupo de: BigCHAP, Bis(polietilenglicol bis[imidazol carbonil]), copolímeros de bloque como polietilenoóxido/polipropilenoóxido copolímeros de bloque como poloxámeros, poloxámero 188 y poloxámero 407, Brij[®] 35, Brij[®] 56, Brij[®] 72, Brij[®] 76, Brij[®] 92V, Brij[®] 97, Brij[®] 58P, Cremophor[®] EL, éter monododecílico de Decaetilenglicol, N-decanoil-N-metilglucamina, n-dodecanoil-N-metilglucamida, alquil-poliglucósidos, aceite de ricino etoxilado, éter monodecílico de heptaetilenglicol, éter monododecílico de heptaetilenglicol, éter monotetradecílico de Heptaetilenglicol, éter monododecílico de hexaetilenglicol, éter monohexadecílico de Hexaetilenglicol, éter monooctadecílico de Hexaetilenglicol, éter monotetradecílico de Hexaetilenglicol, Igepal CA-630, Igepal CA-630, Metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-beta-D-glucopiranosido, éter monododecílico de Nonaetilenglicol, N-Nonanoil-N-metilglucamina, N-Nonanoil-N-metilglucamina, éter monodecílico de octaetilenglicol, éter monodecílico de octaetilenglicol, éter de monohexadecílico de octaetilenglicol, éter monooctadecílico de octaetilenglicol, éter monotetradecílico de octaetilenglicol, octil-beta-D-glucopiranosido, éter monodecílico de pentaetilenglicol, éter monodecílico de pentaetilenglicol, éter monohexadecílico de pentaetilenglicol, éter monohexílico de pentaetilenglicol, éter monooctadecílico de pentaetilenglicol, éter monoocílico de pentaetilenglicol, éter diglicídico de polietilenglicol, éter de polietilenglicol W-1, éter tridecílico de Polioxietileno 10, estearato de polioxietileno 100, éter isohexadecílico de polioxietileno 20, éter oleílico de Polioxietileno 20, estearato de polioxietileno 40, estearato de Polioxietileno 50, estearato de Polioxietileno 8, bis(imidazolil carbonil) Polioxietileno, estearato propilenglicólico de Polioxietileno 25, Saponina de Quillaja bark, Span[®] 20, Span[®] 40, Span[®] 60, Span[®] 65, Span[®] 80, Span[®] 85, Tergitol, Tipo 15-S-12, Tergitol, Tipo 15-S-30, Tergitol, Tipo 15-S-5, Tergitol, Tipo 15-S-7, Tergitol, Tipo 15-S-9, Tergitol, Tipo NP-10, Tergitol, Tipo NP-4, Tergitol, Tipo NP-40, Tergitol, Tipo NP-7, Tergitol, Tipo NP-9, Tetradecil-beta-D-maltósido, éter monodecílico de tetraetilenglicol, éter monododecílico de tetraetilenglicol, éter monotetradecílico de tetraetilenglicol, éter monodecílico de trietilenglicol, éter monododecílico de trietilenglicol, éter monohexadecílico de trietilenglicol, éter monoocílico de trietilenglicol, éter monotetradecílico de trietilenglicol, Triton CF-21, Triton CF-32, Triton DF-12, Triton DF-16, Triton GR-5M, Triton QS-15, Triton QS-44, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-15, Triton X-151, Triton X-200, Triton X-207, Triton[®] X-100, Triton[®] X-114, Triton[®] X-165 solution, Triton[®] X-305 solution, Triton[®] X-405, Triton[®] X-45, Triton[®] X-705-70, TWEEN[®] 20, TWEEN[®] 40, TWEEN[®] 60, TWEEN[®] 6, TWEEN[®] 65, TWEEN[®] 80, TWEEN[®] 81, TWEEN[®] 85, Tiloxapol, esfingofosfolípidos (esfingomielina), y esfingoglicolípidos (ceramidas, gangliosidas), fosfolípidos, y/o n-Undecil beta-D- glucopiranosido.

[0021] Los agentes tensoactivos **zwitteriónicos** se pueden seleccionar del grupo de: CHAPS, CHAPSO, sal interna de 3- (decildimetilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilmiristilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(N,N-Dimetiloctilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio)propanosulfonato, N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, dodecilfosfocolina, miristoil lisofosfatidilcolina, Zwittergent 3-12(N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), Zwittergent 3-10 (sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato), Zwittergent 3-08 (3-(Octildimetilamonio)propanosulfonato), glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, fosfatidilserina), gliceroglicolípidos (galac-topiranosido), alquilo, alcoxilo (éster de alquilo), alcoxi(alquil éter)- derivados de lisofosfatidilo y fosfatidilcolinas, por ejemplo lauroilo y miristoilo derivados de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, esto es colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, acilcarnitinas y derivados, derivados N^{beta}-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados N^{beta}-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutral o ácido, derivado N^{beta}-acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutral y dos aminoácidos cargados, o el agente tensoactivo puede ser seleccionado del grupo de derivados de imidazolina, ácidos grasos de cadena larga y sales de estos C₆-C₁₂ (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, agentes tensoactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (por ejemplo, ésteres 1-acil-sn-glicero-3-fosfato

de etanolamina, colina, serina o treonina), o mezcla de estos.

[0022] El término “alquil-poliglucósidos” como se usa en la presente se relaciona con una cadena de alquilo, alquenilo o alquinilo C₅₋₂₀ lineal o ramificada la cual se sustituye por una o más porciones de glucósido tal como maltósido, sacárido, etc. Formas de realización de estos poliglucósidos de alquilo incluyen poliglucósidos de alquilo C₆₋₁₈. Formas de realización específicas de estos poliglucósidos de alquilo incluyen las cadenas de carbón aún numeradas tales como cadena de alquilo C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈ y C₂₀. Formas de realización específicas de las porciones de glucósido incluyen piranósido, glucopiranósido, maltósido, maltotriósido y sacarosa. En formas de realización de la invención menos de 6 grupos glucósido están anexados al grupo alquilo. En formas de realización de la invención menos de 5 grupos glucósido se anexan al grupo alquilo. En formas de realización de la invención menos de 4 grupos glucósido se anexan al grupo alquilo. En formas de realización de la invención menos de 3 grupos glucósido se anexan al grupo alquilo. En formas de realización de la invención menos de 2 grupos glucósido se anexan al grupo alquilo. Formas de realización específicas de poliglucósidos de alquilo son glucósidos de alquilo tales como n-decil β-D-glucopiranósido, decil β-D-maltopiranósido, dodecil β-D-glucopiranósido, n-dodecil β-D-maltósido, n-dodecil β-D-maltósido, n-dodecil β-D-maltósido, tetradecil β-D-glucopiranósido, decil β-D-maltósido, hexadecil β-D-maltósido, decil β-D-maltotriósido, dodecil β-D-maltotriósido, tetradecil β-D-maltotriósido, hexadecil β-D-maltotriósido, n-dodecil-sacarosa, n-decil-sacarosa, monocaprato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monomiristato de sacarosa, y monopalmitato de sacarosa.

[0023] El término “tratamiento de una enfermedad” como se usa en la presente significa el manejo y cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, condición o trastorno. El propósito de tratamiento es combatir la enfermedad, condición o trastorno. El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, condición o trastorno así como aliviar los síntomas o complicaciones asociadas con la enfermedad, condición o trastorno, y prevención de la enfermedad, condición o trastorno.

[0024] El término “prevención de una enfermedad” como se usa en la presente se define como el manejo y cuidado de un individuo en riesgo de desarrollar la enfermedad antes del inicio clínico de la enfermedad. El propósito de prevención es combatir el desarrollo de la enfermedad, condición o trastorno, e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir o retardar el comienzo de los síntomas o complicaciones y para prevenir o retardar el desarrollo de enfermedades, condiciones o trastornos relacionados.

[0025] El término “análogo” como se usa en la presente en referencia a un péptido significa un péptido modificado en donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido han sido eliminados del péptido y/o en donde uno o más residuos de aminoácido han sido agregados al péptido. La adición o eliminación de residuos de aminoácido puede tener lugar en la terminación N del péptido y/o en la terminación C del péptido. En una forma de realización un análogo comprende menos de 6 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones) relacionadas con el péptido nativo. En otra forma de realización un análogo comprende menos de 5 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones) relacionadas con el péptido nativo. En otra forma de realización un análogo comprende menos de 4 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones) relacionadas con el péptido nativo. En otra forma de realización un análogo comprende menos de 3 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones) relacionadas con el péptido nativo. En otra forma de realización un análogo comprende menos de 2 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones) relacionadas con el péptido nativo. En otra forma de realización un análogo comprende solamente una modificación única (sustituciones, eliminaciones, adiciones) relacionada con el péptido nativo.

[0026] El término “derivado” como se usa en la presente en relación con un péptido precursor significa una proteína precursora modificada químicamente o un análogo de esta, donde por lo menos un sustituyente no está presente en la proteína progenitora o un análogo de esta, esto es, una proteína progenitora la cual ha sido modificada covalentemente. Las modificaciones comunes son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres, PEGilación y similares.

[0027] El término “compuesto GLP-1” como se usa en la presente significa GLP-1(7-37) (SEC ID n.º:1), el análogo insulínico de estos y derivados insulínicos de estos. Ejemplos sin limitación de análogos de GLP-1 son amida GLP-1(7-36), Arg³⁴-GLP-1 (7-37), Gly⁸-GLP-1 (7-37), Val⁸-GLP-1 (7-36)-amida y Val⁸Asp²²-GLP-1 (7-37). Ejemplos no limitantes de derivados de GLP-1 son desamino-His⁷, Arg²⁶, Lys³⁴(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1 (7-37), desamino-His⁷, Arg²⁶, Lys³⁴(N^ε-octanoil)-GLP-1 (7-37), Arg^{26,34}, Lys³⁸(N^ε-(ω-carboxipentadecanoil))-GLP-1 (7-38), Arg^{26,34}, Lys³⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1 (7-36) and Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1 (7-37).

[0028] El término “protegido frente a dipeptidil aminopeptidasa IV” como se usa en la presente significa un compuesto, por ejemplo, un análogo GLP-1, el cual es más resistente a la dipeptidil aminopeptidasa IV (DPP-IV) que el compuesto nativo, por ejemplo, GLP-1(7-37). La resistencia de un compuesto GLP-1 hacia degradación por dipeptidil aminopeptidasa IV se determina por el siguiente ensayo de degradación:

Alícuotas del compuesto GLP-1 (5 nmol) se incuban a 37°C con 1 μl de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada que corresponde a una actividad enzimática de 5 mU durante 10-180 minutos en 100 μl de solución amortiguadora de tielamina-HCL 0.1 M, pH 7.4. Las reacciones enzimáticas se terminan por la adición de 5 μl de ácido trifluoroacético 10%, y los productos de degradación del péptido se separan y cuantifican usando análisis de HPLC. Un método para

realizar este análisis es: Las mezclas se aplican sobre una columna de 250 x 4.6 mm de poro ancho (poros de 30 nm, partículas de 5 µm) Vydac C18 y se eluyen a una velocidad de flujo de 1 ml/min con gradientes graduales de acetonitrilo en ácido trifluoroacético 0.1% (acetonitrilo 0% durante 3 minutos, acetonitrilo 0-24% durante 17 minutos, acetonitrilo 24-48% por 1 minuto) de acuerdo con Siegel y colaboradores, Regul. Pept. 1999; 79:93-102 y Mentlein y colaboradores, Eur. J. Biochem. 1993; 214:829-35. Los péptidos y sus productos de degradación pueden ser monitorizados por su absorbancia a 220 nm (enlaces de péptido) o 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican por integración de sus áreas pico relacionadas con aquellas de estándares. El grado de hidrólisis de un compuesto GLP-1 por dipeptidil aminopeptidasa IV se e

[0029] El término “insulinotrópico” como se usa en la presente en referencia a un péptido o un compuesto significa la capacidad para estimular secreción de insulina en respuesta a un nivel de glucosa en plasma aumentado. Los péptidos y compuestos insulinotrópicos son agonistas del receptor GLP-1. La propiedad insulinotrópica de un compuesto se puede determinar mediante ensayos in vitro o in vivo conocidos en la técnica. El siguiente ensayo in vitro se puede usar para determinar la naturaleza insulinotrópica de un compuesto tal como un péptido. Preferiblemente los compuestos insulinotrópicos exhiben un valor de EC₅₀ en el ensayo siguiente de menos de 5 nM, aún más preferiblemente valores de EC₅₀ menores que 500 pM.

[0030] Las células de riñón de hámster bebé (BHK) que expresan el receptor GLP-1 humano clonado (BHK 467-12A) se crecen en medio DMEM con la adición de 100 UI/mL de penicilina, 100 µl/ml de estreptomycin, 10% de suero fetal de becerro y 1 mg/ml de Geneticin G-418 (Life Technologies). Las membranas de plasma se preparan por homogenización en solución amortiguadora (10 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl y 1 mM ditiotretitol, pH 7.4, que contiene además, 5 mg/mL leupeptina (Sigma), 5 mg/L pepstatina (Sigma), 100 mg/L bacitracina (Sigma), y 16 mg/L aprotinina (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA)). El homogeneizado se centrifugó obteniendo en la parte superior una capa de 41% p/v de sacarosa. La banda blanca entre las dos capas se diluyó en la solución amortiguadora y el centrifugado. Las membranas de plasma se almacenaron a -80°C hasta usarse.

El ensayo del receptor funcional se lleva a cabo mediante la medición de cAMP como una respuesta para la estimulación mediante el péptido insulinotrópico o compuesto insulinotrópico. Las incubaciones se llevan a cabo en placas de microtitulación de 96 pozos en un volumen total de 140 µL y con las siguientes concentraciones finales: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1.5 mM MgSO₄, 1.7 mM ATP, 20 mM GTP, 2 mM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 0.01 % p/v Tween-20, pH 7.4. Los compuestos se disuelven y diluyen en solución amortiguadora. El GTP se prepara de forma fresca para cada experimento 2.5 µg de membrana se agregan a cada pozo y la mezcla se incuba durante 90 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación. La reacción se detiene mediante la adición de 25 µL 0.5 M de HCl. El cAMP formado se mide por un ensayo de proximidad de escintilación (RPA 542, Amersham, UK). Unas curvas de respuesta de dosis se representan en gráficos para el compuesto y el valor de EC₅₀ se calcula usando el software GraphPad Prism.

[0031] El término “profármaco de un compuesto insulinotrópico” como se usa en la presente significa un compuesto modificado químicamente el cual después de la administración al paciente se convierte en un compuesto insulinotrópico. Los fármacos son versiones o ésteres extendidos de aminoácido comúnmente de un compuesto insulinotrópico.

[0032] El término “compuesto de exendina 4” como se usa en la presente se define como exendina 4(1-39) (SEC ID n.º 2), los fragmentos insulinotrópicos de estos, análogos insulinotrópicos de estos y derivados insulinotrópicos de estos. Los fragmentos insulinotrópicos de exendina-4 son péptidos insulinotrópicos para los cuales la secuencia completa se puede encontrar en la secuencia de exendina-4 (SEC ID n.º 2) y donde por lo menos un aminoácido terminal se ha eliminado. Ejemplos de fragmentos insulinotrópicos de exendina-4(1-39) son exendina-4 (1-38) y exendina-4(1-31). La propiedad insulinotrópica de un compuesto se puede determinar mediante ensayos in vivo o in vitro bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un animal y monitorizar la concentración de insulina en el tiempo. Los análogos de exendina-4(1-39) se refieren a las moléculas respectivas donde uno o más de los residuos de aminoácidos se han intercambiado con otros residuos de aminoácidos y/o del cual uno o más residuos de aminoácidos han sido eliminados y/o del cual uno o más residuos de aminoácidos se han agregado con la condición de que el análogo bien sea insulinotrópico o sea un profármaco de un compuesto insulinotrópico. Un ejemplo de un análogo insulinotrópico de exendina-4(1-39) es Ser²Asp³-exendina-4(1-39) donde los residuos de aminoácidos en posición 2 y 3 se han reemplazado con serina y ácido aspártico, respectivamente (este análogo particular también se conoce en la técnica como exendina-3). Los derivados insulinotrópicos de exendina-4(1-39) y análogos de éste son lo que la persona experta en la técnica considere que son derivados de estos péptidos, esto es, que tienen por lo menos un sustituyente el cual no está presente en la molécula progenitora del péptido con el propósito de que el derivado sea insulinotrópico o un profármaco de un compuesto insulinotrópico. Ejemplos de sustituyentes son las amidas, carbohidratos, grupos alquilo, ésteres y sustituyentes lipofílicos. Un ejemplo de unos derivados insulinotrópicos de exendina-4(1-39) y análogos de estos es la Tyr³¹-exendina-4(1-31)-amida.

[0033] El término “compuesto exendina-4 estable” como se usa en la presente significa una exendina-4(1-39) modificada químicamente, esto es, un análogo o un derivado el cual exhibe una vida media de eliminación de plasma in vivo de por lo menos 10 horas en el hombre, como se determina por el método descrito bajo la definición de “compuesto GLP-1 estable”.

[0034] El término “compuesto de exendina-4 protegido frente a dipeptidil aminopeptidasa IV” como se usa en la presente significa un compuesto de exendina-4 que es más resistente a la peptidasa de plasma dipeptidil aminopeptidasa IV (DPP-IV) que la exendina-4 (SEC ID n.º2), como se determinó por el ensayo descrito bajo la definición de compuesto de GLP-1 protegido frente a la dipeptidil aminopeptidasa IV.

5 [0035] El término “punto isoeléctrico” como se usa en la presente significa el valor de pH en donde la carga neta general de una macromolécula tal como un péptido es cero. En péptidos puede haber varios grupos cargados, y en el punto isoeléctrico la suma de todas las cargas es cero. A un pH por encima del punto isoeléctrico la carga neta general del péptido será negativa, si en los valores de pH bajos el punto isoeléctrico la carga neta general del péptido será positiva.

10 [0036] El término “reconstituido” como se usa en la presente refiriéndose a una composición farmacéutica significa una composición acuosa que se ha formado mediante la adición de agua a un material sólido que comprende el ingrediente farmacéutico activo. Las composiciones farmacéuticas para reconstitución se aplican donde una composición líquida con vida de almacenamiento aceptable no se puede producir. Un ejemplo de una composición farmacéutica reconstituida es la solución que resulta cuando se agrega agua a una composición secada por congelamiento. La solución a menudo es para administración parenteral y así el agua para inyección comúnmente se usa para reconstitución del material sólido.

[0037] El término “alrededor” como se usa en la presente significa en cercanía razonable del valor numérico establecido, tal como más o menos 10%.

20 [0038] En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica comprende una solución amortiguadora que es una solución amortiguadora de fosfato.

En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica comprende una solución amortiguadora que es una solución amortiguador zwitteriónica.

En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica comprende una solución amortiguadora que se selecciona del grupo que consiste en glicil glicina, TRIS, bicina, HEPES, MOBS, TES y mezclas de estos.

25 En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica comprende un modificador de tonicidad seleccionado del grupo que consiste en glicerol, propilenglicol y manitol.

En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica el conservante se selecciona del grupo que consiste en fenol, m-cresol, metil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato, 2-fenoxietanol, butil p-hidroxibenzoato, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol, tiomerosal y mezclas de estos.

30 En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica comprende un péptido insulínico que es un péptido protegido DPP-IV.

En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica el péptido insulínico comprende un sustituyente lipofílico seleccionado del grupo que consiste en $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ donde n es 4 a 38, y $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ donde m es de 4 a 38.

35 En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica el péptido insulínico es GLP-1 acilado o un análogo de GLP-1 acilado.

40 En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica comprende un péptido insulínico el cual es un análogo de GLP-1 acilado donde el análogo de GLP-1 es seleccionado del grupo que consiste de Arg³⁴-GLP-1(7-37), Gly³-GLP-1(7-36)-amida, Gly³-GLP-1(7-37), Val⁸-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸-GLP-1(7-37), Aib⁸-GLP-1(7-36)-amida, Aib⁸-GLP-1(7-37), Val⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Lys²²-GLP-1(7-37), Val⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Arg²²-GLP-1(7-37), Val⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸His²²-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁹Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²VaP-GLP-1(7-37), Val⁸Tyr¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Leu¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Tyr¹⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1 (7-37), y análogos de estos.

45 En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica el péptido insulínico es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))²⁶-GLP-1(7-37).

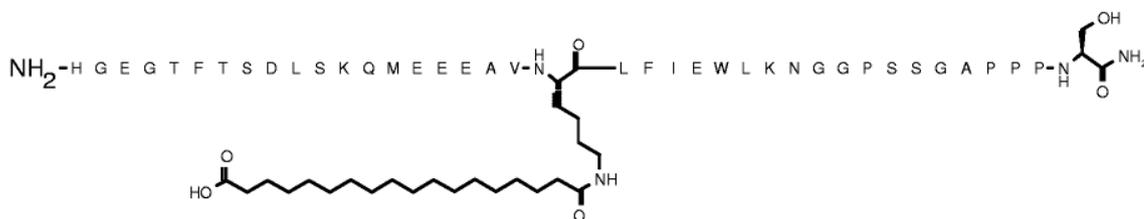
50 En otra forma de realización de la invención la concentración del péptido insulínico está en el intervalo desde alrededor de 0.1 mg/ml hasta alrededor de 25 mg/ml, en el intervalo de desde alrededor de 1 mg/ml hasta alrededor de 25 mg/ml, en el intervalo desde alrededor de 2 mg/ml hasta alrededor de 15 mg/ml, en el intervalo desde alrededor de 3 mg/ml hasta alrededor de 10 mg/ml, o en el intervalo desde alrededor de 5 mg/ml hasta alrededor de 8 mg/ml.

En otra forma de realización de la invención el péptido insulínico es exendina-4 o ZP-10, esto es,

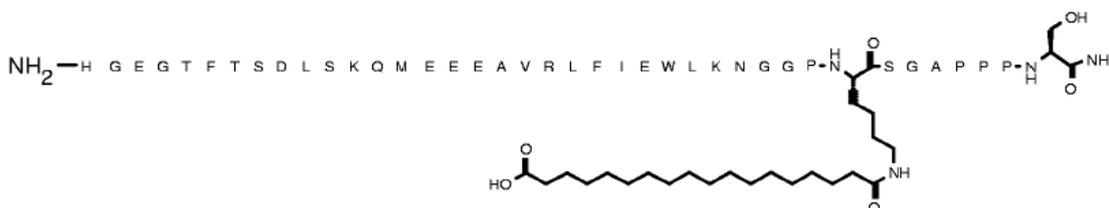
HGEGTFTSDLKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKSKKKK-NH₂.

En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica el péptido insulínico es exendina-4 acilado o un análogo de exendina-4 acilado.

5 En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica el péptido insulínico es [N-epsilon(ácido 17-carboxiheptadecanoico)20 exendina-4(1-39)-amida



N-epsilon32-(17-carboxi-heptadecanoil)[Lys32]exendina-4(1-39)amida



10 [0039] En otra forma de realización de la invención la composición farmacéutica la concentración del péptido insulínico en la composición farmacéutica es desde alrededor de 5 µg/ml hasta alrededor de 10 mg/ml, desde alrededor de 5 µg/ml hasta alrededor de 5 mg/ml, desde alrededor de 5 µg/ml hasta alrededor de 5 mg/ml, desde alrededor de 0.1 mg/ml hasta alrededor de 3 mg/ml, o desde alrededor de 0.2 mg/ml hasta alrededor de 1 mg/ml.

[0040] En otro aspecto la presente invención se relaciona a un método para preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, el método que comprende la disolución del péptido insulínico y la incorporación del conservante y modificador de tonicidad.

15 La presente invención también se refiere a un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, cuyo método comprende el calentamiento de una solución del compuesto GLP-1 a pH alcalino a una temperatura por encima de 40 °C durante al menos 5 minutos. Las concentraciones del compuesto GLP-1 durante el tratamiento térmico generalmente se prefiere que estén en el intervalo desde 10 g/l hasta 100 g/l. El compuesto GLP-1 se puede disolver en una solución acuosa que tiene temperatura ambiente seguida por calentamiento a la temperatura apropiada durante el tiempo especificado.

25 Se ha mostrado que la estabilidad física del compuesto GLP-1, liraglutida, fue mejorada significativamente conforme la temperatura del tratamiento térmico se incrementó (22 hasta 80 °C). Para temperaturas de 60 y 80 °C, el tiempo de tratamiento térmico se mostró que tiene una influencia fuerte en la estabilidad física de la liraglutida, ya que 120 minutos de tratamiento térmico demostraron mejorar la estabilidad física significativamente en comparación con 1 minuto de tratamiento térmico. También se ha demostrado que la estabilidad física de la liraglutida se mejoró significativamente por incremento de la temperatura desde 22 hasta 50-80 °C a pH de 9-10 (cn.f. ejemplos). Para todas las temperaturas, el tiempo de tratamiento térmico demostró tener una influencia en la estabilidad física de la liraglutida, ya que 15 hasta 20 minutos de tratamiento térmico demostraron mejorar la estabilidad física significativamente comparada con 1 minuto de tratamiento térmico.

30 Las condiciones óptimas para el tratamiento térmico para disolver gérmenes de fibrilo parecen ser de 3-20 minutos a pH de 9-10.5 y 70-85°C. En la escala de producción, esto se podría realizar usando métodos comunes para calentamiento y enfriamiento rápido de volúmenes grandes mediante intercambiadores térmicos.

35 En otro aspecto la presente invención se relaciona a un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, cuyo método comprende el calentamiento de una solución del compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8.0 hasta pH 10.5 a una temperatura entre 50°C hasta 80 °C por un período de tiempo el cual está entre 3 minutos y 180 minutos.

En una forma de realización la presente invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, cuyo método comprende el calentamiento de una solución del compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8.0 hasta pH 10.0 a una temperatura entre 50°C hasta 80 °C por un período de tiempo el

cual está entre 3 minutos y 180 minutos.

En otra forma de realización la presente invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, cuyo método comprende el calentamiento de una solución del compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8.0 hasta pH 10.0 a una temperatura entre 50°C hasta 80 °C por un período de tiempo el cual está entre 3 minutos y 120 minutos.

5

En otra forma de realización la temperatura está entre 60 °C y 80 °C por un período de tiempo que está entre 5 minutos y 15 minutos.

En otra forma de realización la temperatura está entre 60 °C y 80 °C por un período de tiempo que está entre 1 minuto y 15 minutos.

10 En otra forma de realización la temperatura está entre 60 °C y 80 °C por un período de tiempo que está entre 3 minutos y 30 minutos.

En otra forma de realización la temperatura está entre 60 °C y 80 °C por un período de tiempo que está entre 5 minutos y 30 minutos.

15 En otra forma de realización la presente invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de exendina-4, cuyo método comprende el calentamiento de una solución de exendina-4 que tiene un pH entre pH 8.0 hasta pH 10.0 a una temperatura entre 50°C y 80 °C por un período de tiempo el cual está entre 3 minutos y 120 minutos.

En otra forma de realización la presente invención se relaciona a un método para la preparación de una solución estable de Aib^{8,35}-GLP-1(7-36)-amida, cuyo método comprende calentamiento de una solución de Aib^{8,35}- GLP-1 (7-36)-amida que tiene un pH entre pH 8.0 hasta pH 10.0 a una temperatura entre 50°C y 80 °C por un período de tiempo el cual está entre 3 minutos y 120 minutos.

20

En otra forma de realización el compuesto GLP-1 es Arg³⁴,Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1(7-37).

En un aspecto la invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, método que comprende el calentamiento de una solución del compuesto GLP-1.

25 En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde la temperatura está entre 50 °C y 95 °C.

En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde la temperatura está entre 60 °C y 95 °C.

En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde la temperatura está entre 50 °C y 80 °C.

En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde la temperatura está entre 70 °C y 80 °C.

En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde la temperatura está entre 60 °C y 80 °C.

30 En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde el pH está entre alrededor de 8.0 hasta 10.5.

En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde el pH está entre alrededor de 8.0 hasta 10.0.

35 En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde el pH está entre alrededor de 8.0 hasta 9.7.

En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde el pH está entre alrededor de 7.5 hasta 8.5.

En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde el pH está alrededor de 7.7.

En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde el pH está alrededor de 8.15;

40 En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde el calentamiento se continúa por un período de tiempo el cual está entre 3 minutos y 180 minutos.

En un aspecto la invención se relaciona con un método como el anterior donde el calentamiento se continúa por un período de tiempo el cual está entre 10 minutos y 90 minutos.

45 En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde el calentamiento se continúa por un período de tiempo el cual está entre 3 minutos y 30 minutos.

En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior donde el calentamiento se continúa por un

período de tiempo el cual está entre 5 minutos y 15 minutos.

En un aspecto la invención se refiere a un método como el anterior, donde el pH está entre pH 8.0 hasta pH 10.5 y el método incluye calentamiento a temperatura entre 50 °C y 85 °C por un período de tiempo el cual está entre 3 minutos y 180 minutos.

5 En otro aspecto la presente invención se refiere a un método para la preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un compuesto GLP-1, método que comprende el calentamiento de una solución del compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8.0 hasta pH 10.0 a temperatura entre 50 °C y 85 °C por un período de tiempo el cual está entre 3 minutos y 180 minutos.

10 En otro aspecto la presente invención se refiere a un método para la preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un compuesto GLP-1, método que comprende el calentamiento de una solución del compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8.0 hasta pH 10.0 a temperatura entre 50 °C y 80 °C por un período de tiempo el cual está entre 3 minutos y 120 minutos.

15 En un aspecto la invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, cuyo método comprende el calentamiento de una solución del compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8.0 hasta pH 10.0 a temperatura entre 70 °C y 80 °C por un período de tiempo el cual está entre 3 minutos y 30 minutos.

En un aspecto la invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, método que comprende el calentamiento de una solución del compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8.0 hasta pH 10.0 a temperatura entre 60 °C y 80 °C por un período de tiempo el cual está entre 5 minutos y 15 minutos.

20 En un aspecto la invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, método que comprende el calentamiento de una solución del compuesto GLP-1 a temperatura entre 60 °C y 95 °C por un período de tiempo el cual está entre 10 minutos y 90 minutos.

25 El aspecto anterior incluye valores de pH de las soluciones desde alrededor de 7.5 hasta alrededor de 8.5. En un aspecto de la invención el pH está alrededor de 7.7. En un aspecto de la invención el valor de pH está alrededor de 8.15.

En un aspecto la invención se refiere a un método para preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un compuesto GLP-1, método que comprende uno o más de los métodos de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores seguido por la adición de excipientes farmacéuticamente aceptables.

30 En un aspecto la invención se refiere a un método para preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un compuesto GLP-1, método que comprende un producto de péptido en volumen el cual se ha producido por el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores seguidos de secado por congelamiento de la solución o suspensión del péptido similar a glucagón.

35 En un aspecto la invención se refiere a un método para preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un compuesto GLP-1, método que comprende que la composición farmacéutica se prepare a partir de un producto secado por congelamiento de acuerdo con el aspecto anterior seguido por un tratamiento de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores.

40 En un aspecto la invención se refiere a un método para preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un compuesto GLP-1, método que comprende que la composición farmacéutica se prepare como se describe en el aspecto anterior y seguida por un tratamiento de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, ya sea antes de llenado en un sistema de administración final o después de llenado del sistema de administración final o ambos.

En un aspecto la invención se refiere a un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, donde el compuesto GLP-1 es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37).

45 En otro aspecto la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de hiperglicemia que comprende la administración parenteral de una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un mamífero en necesidad del tratamiento.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de obesidad, deficiencia de células beta, IGT o dislipidemia que comprende administración parenteral de una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un mamífero en necesidad del tratamiento.

50 EJEMPLOS

Procedimiento General.

Ensayo de fibrilación de Tioflavina T (ThT): Principio y ejemplos.

[0041] La estabilidad física baja de un péptido puede llevar a formación de fibrilo amiloide, el cual se observa como estructuras macromoleculares en tipo de hebras bien ordenadas en la muestra que eventualmente resultan en la formación de gel. Esto se ha medido tradicionalmente por inspección visual de la muestra. Sin embargo, ese tipo de mediciones es muy subjetivo y depende del observador. Por lo tanto, la aplicación de una sonda indicadora de molécula pequeña es mucho más ventajosa. La tioflavina T (ThT) es una sonda tal y tiene una señal fluorescente distinta cuando se enlaza a fibrilos [Naiki y colaboradores, (1989) Anal. Biochem. 177, 244-249; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309, 274-284].

[0042] El curso del tiempo para la formación de fibrilo se puede describir por una curva sigmoide con la siguiente expresión [Nielsen y colaboradores, (2001) Biochemistry 40, 6036-6046], cn.f figura 6:

$$F = f_i + m_i t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}} \quad \text{Eq.(1)}$$

[0043] Aquí, F es la fluorescencia de ThT el tiempo t. La constante t_0 es el tiempo necesario para alcanzar el 50% de la fluorescencia máxima. Los dos parámetros importantes que describen la formación de fibrilo son el tiempo de latencia calculado por $t_0 - 2\tau$ y la constante de velocidad aparente $k_{app} = 1/\tau$.

[0044] La formación de un producto intermedio del péptido plegado parcialmente se sugiere como un mecanismo de iniciación general para fibrilación. Pocos de estos productos intermedios forman un núcleo para formar una plantilla en la cual posteriores intermediarios se pueden ensamblar y procede la fibrilación. El tiempo de latencia corresponde al intervalo en el cual la masa crítica de núcleo se construye y la constante de velocidad aparente es el grado con el cual se forma el fibrilo por sí mismo.

Preparación de Muestra.

[0045] Las muestras fueron recién preparadas antes de cada ensayo. La composición de cada muestra se describe en la leyenda. El pH de la muestra se ajustó al valor deseado usando cantidades apropiadas de NaOH y HClO₄ concentrado. La Tioflavina T se agregó a las muestras a partir de una solución de almacenamiento en H₂O a una concentración final de 1 μM.

Alícuotas de muestra de 200 μl fueron colocadas en una placa de microtitulador de 96 pozos (Packard OptiPlate™-96, poliestireno blanco). Usualmente, ocho réplicas de cada muestra (que corresponden a una condición de prueba) se colocan en una columna de pozos. La placa se selló con Scotch Pad (Qiagen).

Incubación y medición de fluorescencia.

[0046] La incubación a temperatura dada, la agitación y medición de la emisión de fluorescencia ThT fueron hechas en un lector de placa de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems). La temperatura se ajustó a 37 °C. La agitación orbital se ajustó a 960 rpm con una amplitud de 1 mm en todos los datos presentados. La medición de fluorescencia se hizo usando excitación a través de un filtro de 444 nm y medición de emisión a través de un filtro de 485 nm.

Cada proceso se inició mediante incubación de la placa a la temperatura de ensayo por 10 minutos. La placa se midió cada 20 minutos durante normalmente 45 horas. Entre cada medición, la placa se agitó y se calentó como se describe.

Manejo de Datos.

[0047] Los puntos de medición fueron guardados en formato Microsoft Excel para posterior procesamiento y dibujo de curva y el ajuste se realizó usando GraphPad Prism. La emisión de fondo de ThT en ausencia de fibrilos fue insignificante. Los puntos de datos comúnmente son un promedio de los ocho muestras y se muestran con barras de error de desviación estándar. Solamente los datos obtenidos en el mismo experimento (esto es, muestras en la misma placa) se presentan en la misma gráfica asegurando una medición relativa de fibrilación entre las muestras individuales de un ensayo mejor que la comparación entre ensayos diferentes.

El conjunto de datos puede ser ajustado a Eq. (1). Sin embargo, puesto que las curvas sigmoides completas en este caso usualmente no se alcanzan durante el tiempo de medición, el grado de fibrilación se expresa como fluorescencia de ThT en varios momentos calculados como el promedio de los ocho ejemplos y se muestran con la desviación estándar.

Ejemplo 1

[0048] El ensayo de fibrilación de ThT de una composición farmacéutica del análogo GLP-1 acilado liraglutida se

realizó según procedimientos descritos en “procedimiento general”. Después de aproximadamente 10 horas la emisión de fluorescencia de ThT aumenta indicando el inicio de la fibrilación. Esta señal se incrementa continuamente y alcanza un plano antes de que el ensayo se termine. En la presencia de 200 ppm de Poloxámero 188, sin embargo, la señal de fluorescencia de ThT permanece en el nivel del fondo. Esto indica que no ocurre fibrilación y, de ahí, la composición farmacéutica es estable físicamente bajo estas condiciones. Las composiciones farmacéuticas usadas en el ejemplo 1 (Figura 1) no se adiciona con una solución amortiguadora.

Ejemplo 2

[0049] El efecto del Poloxámero 188 en una composición farmacéutica de liraglutida que contiene fosfato de sodio como una solución amortiguadora (experimental realizado de acuerdo al procedimiento descrito en “Procedimiento General”). Ahí, la presencia de 50 ppm de Poloxámero 188 prolonga el tiempo de latencia antes del comienzo de la fibrilación, considerando que 100 ppm de Poloxámero 188 inhiben completamente la fibrilación durante el tiempo de ensayo.

Ejemplo 3

[0050] El Polisorbato 20 también estabiliza las formulaciones de liraglutida. Un ejemplo tal se muestra en la Figura 3 (experimental realizado de acuerdo al procedimiento descrito en “Procedimiento General”). La presencia de 200 ppm de Polisorbato 20 atenúa la fibrilación, lo cual se observa como una velocidad de crecimiento retardada de la señal de fluorescencia ThT. De ahí, se observa una señal de fluorescencia ThT significativamente menor en la muestra de Polisorbato 20 que en la referencia después de 40 horas de incubación.

Ejemplo 4

[0051] Se preparan dos composiciones farmacéuticas:

F1. 1.2 mM de liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 3 Zn/hexámero, aspart 0.6 mM, 8 mM de bicina, 50 ppm poloxámero 188, pH 7.7.

F2. 1.2 mM de liraglutida, 14 mg/ml propilenglicol, 40 mM de fenol, 3 Zn/hexamero, aspart 0.6 mM, 8 mM de bicina, pH 7.7.

[0052] La estabilidad física de las composiciones farmacéuticas se evalúa por medio de una prueba de tensión acelerada. La prueba de tensión se realiza como una prueba de rotación. 50 de aire se agregan a 5 cartuchos (frascos de cristal) de cada formulación. Los cartuchos se rotan con una frecuencia de 30 rotaciones por minuto durante 4 horas diariamente. La prueba se detiene después de 22 días de rotación. La inspección de los cartuchos se sigue diariamente o como se requiera. La turbidez de las composiciones farmacéuticas se caracteriza por medición nefelométrica de la turbidez en un HACH Turbidimeter 2100AN. La medición de turbidez de un líquido se especifica en "Nephelometric Turbidity Unit" (NTU). La inestabilidad física de la proteína se caracteriza por mediciones de turbidez alta.

El experimento muestra que la composición F2 tiene un incremento mucho más rápido en NTU comparado con aquel de la composición F1.

Ejemplo 5

[0053] Se prepararon tres composiciones farmacéuticas:

F1. 1.6 mM de liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, pH 7.7.

F2. 1.6 mM de liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, 100 µg/ml de poloxámero 188, pH 7.7.

F3. 1.6 de mM liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, 200 µg/ml de poloxámero 188, pH 7.7.

[0054] Las composiciones farmacéuticas F1-F3 se sometieron a la prueba de rotación como se describe en el ejemplo 4.

Ejemplo 6

[0055] Se prepararon dos composiciones farmacéuticas:

F1. 1.6 mM de liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, 0 µg/ml poloxámero 407 (Pluronic F-127), pH 7.7.

F2. 1.6 mM de liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, 200 µg/ml de poloxámero 407 (Pluronic F-127), pH 7.7.

[0056] Las formulaciones fueron evaluadas con respecto a la estabilidad física usando el ensayo de Tioflavina T. Las formulaciones se colocaron en placas de 96 pozos (Black NUNC) y se incubaron a 37 °C durante hasta 72 horas en el fluorímetro de placa de microtitulador BMG FLUOstar usando el siguiente programa: [300 rpm 15 min, 5 min descansos]_{n = 72}.

5 Ejemplo 7

[0057] La solución 1 se preparó mediante disolución del conservante, agente isotónico, y solución amortiguadora en agua, el pH se ajustó a 7.3. En otro recipiente la solución 2 se preparó: la liraglutida se disolvió en agua caliente a 60 °C y se mantuvo en un baño de agua a 60 °C por 1, 20, y 120 minutos. El tratamiento térmico de la liraglutida se llevó a cabo en una solución que tiene pH de alrededor de 8 y 10. Después del tratamiento térmico de la solución 2 se enfrió a 22 °C cuando después las dos soluciones fueron mezcladas y el pH se ajustó a 7.7 usando hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0.22 µm.

[0058] La estabilidad física de las preparaciones de liraglutida se evaluó mediante el uso de un método de fluorescencia; la prueba de Tioflavina T en la cual la tinta de tiazol histológica Tioflavina T (ThT) se usa como un indicador de formación de fibrilo. Mediante el uso de la prueba de Tioflavina T fue posible determinar la presencia de fibrilos en las diferentes formulaciones. El método se basó en las características fluorescentes de ThT. En la presencia de fibrilos, la fluorescencia de ThT exhibió una excitación máxima a 450 nm y mejoró la emisión en 482 nm. La intensidad de fluorescencia ThT se ha demostrado que es lineal con un incremento en la concentración del fibrilo.

La ThT se usó en una prueba de tensión aplicando las diferentes formulaciones en placas de microtitulador con ThT a 35 °C y se agitaron a 350 rpm hasta que las formulaciones fueron fibriladas. Se obtuvieron las gráficas de la intensidad de fluorescencia (FI) en función del tiempo (seg). La variable de respuesta fue; tiempo (segundos) hasta lograr una intensidad de fluorescencia de 400, por ejemplo, cuanto mayor tiempo para alcanzar FI = 400, más estable es una formulación.

La pureza de las preparaciones de liraglutida se midió mediante RP-HPLC.

25 Los siguientes experimentos son sin agente tensoactivo-tratamiento térmico 3

Ejemplo 7a

[0059] La solución 1 se prepara mediante disolución del conservante, agente isotónico, y solución amortiguadora en agua, el pH se ajustó a 7.9. En otro recipiente la solución 2 se preparó: la liraglutida se disolvió en agua caliente a 60 °C y se mantuvo en un baño de agua a 60 °C por 1, 20, y 120 minutos. El tratamiento térmico de la liraglutida se llevó a cabo en solución que tiene pH de alrededor de 8 y 10. Las dos soluciones fueron mezcladas y el pH se ajustó a 8.15 usando hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0.22 µm.

[0060] La estabilidad física de las preparaciones de liraglutida se evaluó mediante el uso de un método de fluorescencia; la prueba de Tioflavina T en la cual la tinta de tiazol histológica Tioflavina T (ThT) se usa como un indicador de formación de fibrilo. Mediante el uso de la prueba de Tioflavina T fue posible determinar la presencia de fibrilos en las diferentes formulaciones. El método se basó en las características fluorescentes de ThT. En la presencia de fibrilos, la fluorescencia de ThT exhibió una excitación máxima a 450 nm y mejoró la emisión en 482 nm. La intensidad de fluorescencia ThT ha demostrado ser lineal con un incremento en la concentración del fibrilo.

Ejemplo 8

[0061] La solución 1 se preparó mediante disolución del conservante, agente isotónico, y solución amortiguadora en agua, el pH se ajustó a 7.3. En otro recipiente la solución 2 se preparó: la liraglutida se disolvió en agua caliente a 80 °C y se mantuvo en un baño de agua a 80 °C durante 1, 30, y 120 minutos. El tratamiento térmico de la liraglutida se llevó a cabo en una solución que tiene pH de alrededor de 8 y 10. Después del tratamiento térmico la solución 2 se enfrió a 22°C donde después las dos soluciones se mezclaron y el pH se ajustó a 7.7 utilizando hidróxido sódico y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0.22 µm.

La estabilidad física y pureza de las preparaciones se midieron como se describe en el ejemplo 7. Los resultados de los experimentos se describen en las figuras 4 y 5.

Ejemplo 8a

[0062] La solución 1 se preparó mediante disolución del conservante, agente isotónico, y solución amortiguadora en agua, el pH se ajustó a 7.9. En otro recipiente la solución 2 se preparó: la liraglutida se disolvió en agua caliente a 80 °C y se mantuvo en un baño de agua a 80 °C por 1, 20, y 120 minutos. El tratamiento térmico de la liraglutida se llevó a cabo en solución que tiene pH de alrededor de 8 y 10. Las dos soluciones fueron mezcladas y el pH se ajustó a 8.15 usando hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0.22 µm.

5 La estabilidad física de las preparaciones de liraglutida se evaluó mediante el uso de un método de fluorescencia; la prueba de Tioflavina T en la cual la tinta de tiazol histológica Tioflavina T (ThT) se usa como un indicador de formación de fibrilo. Mediante el uso de la prueba de Tioflavina T fue posible determinar la presencia de fibrilos en las diferentes formulaciones. El método se basó en las características fluorescentes de ThT. En la presencia de fibrilos, la fluorescencia de ThT exhibió una excitación máxima en 450 nm y mejoró la emisión en 482 nm. La intensidad de fluorescencia ThT se demuestra ser lineal con un incremento en la concentración del fibrilo.

Ejemplo 9

10 [0063] La solución 1 se preparó mediante disolución del conservante, agente isotónico, y solución amortiguadora en agua, el pH se ajustó a 7.3. En otro recipiente la solución 2 se preparó: la liraglutida se disolvió en agua de varias temperaturas: 22, 40, 60, y 80 °C y se mantuvo en un baño de agua durante 15 minutos para todas las temperaturas investigadas. El tratamiento térmico de la liraglutida se llevó a cabo en solución que tiene pH de alrededor de 10. Después del tratamiento térmico la solución 2 se enfrió a 22 °C donde después las dos soluciones fueron mezcladas y el pH se ajustó a 7.7 usando hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0.22 µm.

15 [0064] La estabilidad física y pureza de las preparaciones se midieron como se describe en el ejemplo 7.

Los resultados de los experimentos se representan en la figura 6.

Ejemplo 10

20 [0065] Antes de que la sustancia del fármaco de liraglutida se seque por congelamiento, se disuelve en agua caliente a 70-80 °C a un pH de alrededor de 8.0-10.0 hasta una concentración de 10-100 g/l. El tratamiento térmico se lleva a cabo durante 3-30 minutos. De ahí en adelante la DS se seca por congelamiento. Posteriormente, la sustancia de fármaco secada por congelamiento se disuelve en agua. La concentración es alrededor de 10-100 g/L y el pH de la solución (solución 2) es alrededor de 8-10. Otra solución (solución 1) se prepara mediante disolución del conservante, agente isotónico, y solución amortiguadora en agua, el pH se ajustó a 7.9. Las dos soluciones se mezclaron y el pH se ajustó a 8.15 usando hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico.

25 Ejemplo 10a.

[0066] El tratamiento base del ejemplo 10a se puede realizar con o sin el tratamiento térmico descrito del ejemplo 10 antes del secado por congelamiento. En una forma de realización especial el tratamiento de la sustancia de fármaco en el ejemplo 10a se puede realizar a 75 °C durante 8 minutos antes de secado por congelamiento.

Ejemplo 10b.

30 [0067] Antes del secado por congelamiento la sustancia fármaco de liraglutida se disuelve en agua caliente a 70-80 °C a un pH de alrededor de 8.0-10.0 hasta una concentración de 10-100 g/l. El tratamiento térmico se lleva a cabo durante 3-30 minutos. De ahí en adelante la DS se seca por congelamiento. Posteriormente, la sustancia de fármaco secada por congelamiento se disuelve en agua. La concentración es alrededor de 10-100 g/L y el pH de la solución (solución 2) es alrededor de 8-10. Otra solución (solución 1) se prepara mediante disolución del conservante, agente isotónico, y solución amortiguadora en agua, el pH se ajustó a 7.3. Las dos soluciones se mezclaron y el pH se ajustó a 7.7 usando hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico.

Ejemplo 10c.

40 [0068] El tratamiento base del ejemplo 10c se puede realizar con o sin el tratamiento térmico descrito del ejemplo 10b antes de secado por congelamiento. En una forma de realización especial el tratamiento de la sustancia de fármaco en el ejemplo 10c se puede realizar a 75°C durante 8 minutos antes del secado por congelamiento.

Ejemplo 11

45 [0069] La liraglutida se disolvió en agua a temperatura ambiente y el pH se ajustó a pH 10. La solución se calentó en un baño de agua a 50 y 80°C por 1, 3, 5 y 20 minutos. Después del tratamiento térmico, la solución se enfrió a 22°C en un baño de agua. La solución se filtró luego a través de un filtro de 0.22 µm y se secó por congelamiento. El polvo se disolvió en una solución que contiene conservante, agente isotónico, y componentes de solución amortiguadora y el pH se ajustó a pH 7.7 usando hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico.

[0070] La estabilidad física de preparaciones de liraglutida tratadas térmicamente se evaluó mediante el uso del método de Tioflavina T descrito en el ejemplo 7. La estabilidad química de las preparaciones se midió usando HPLC de fase inversa.

50 Los resultados se representan en las figuras 7 y 8.

Ejemplo 12

[0071] La liraglutida se disolvió en agua a temperatura ambiente y el pH se ajustó a pH 9 y 10. La solución se calentó en un baño de agua a 60 y 80°C por 1 y 15 minutos. Después del tratamiento térmico, la solución se enfrió a 22 °C en un baño de agua. La solución se filtró luego a través de un filtro de 0.22µm y se secó por congelamiento.

5 El polvo se disolvió en una solución que contiene componentes de conservante, agente isotónico, y componentes de solución amortiguadora y el pH se ajustó a pH 7.7.

[0072] La estabilidad física de preparaciones de liraglutida tratadas térmicamente se evaluó mediante el uso del método Tioflavina T descrito en el ejemplo 7. La estabilidad química de las preparaciones se midió usando HPLC de fase inversa.

10 [0073] Los resultados se representan en la figura 9.

Ejemplo 13

[0074] Las formulaciones se mezclaron de acuerdo con las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Excipientes mantenidos constantes.

Parámetro	Concentración
Liraglutida	6.25 mg/ml
Propilén glicol	14.0 mg/ml
Fenol	5.50 mg/ml
Tioflavin T	1 mM
pH = 7.7	

15

Tabla 2. Excipientes específicos.

Excipientes	Concentración
Solutol HS-15	100 o 200 µg/MI
Pluronic F-127 (Poloxámero 407)	100 o 200 µg/MI
Fosfato de hidrógeno di sódico, di-hidrato	8 mM
Tricina	10 mM

20

8 x 250 µl de cada formulación (8 repeticiones) se pipetea en una placa de 96 pozos (Black NUNC). Posteriormente, las placas fueron selladas usando "Cinta de sellado para placas, NUNC".

25 La placa se insertó en un fluorímetro de placa de microtitulador BMG GLUOstar. La excitación se midió a 440 ± 10 nm y la emisión a 480 ± 10 nm. Los datos se muestrearon para 72 horas (aproximadamente 260 000 segundos). El fluorímetro de placa de microtitulador BMG GLUOstar se programó como se indica en la presente: [600 rpm durante 300 segundos, reposo 100 segundos]_{n = 72} usando rotación orbital doble.

30 [0075] Las formulaciones que contienen Solutol HS-15 en solución amortiguadora de fosfato son solamente ligeramente más estables que la formulación de referencia. Las formulaciones que contienen ya sea 100 o 200 µg/ml de Pluronic F-127 en solución amortiguadora de fosfato son más estables. De forma interesante, las formulaciones que contienen ya sea Solutol HS-15 o Pluronic F-127 en solución amortiguadora de tricina son excepcionalmente estables, especialmente la última.

Ejemplo 14

35 [0076] La solución 1 se preparó mediante disolución del conservante, agente isotónico, y solución amortiguadora en agua, el pH se ajustó a 7.9. En otro recipiente la solución 2 se preparó: la liraglutida se disolvió en agua caliente a 60-70 °C y se mantuvo en un baño de agua a 50, 60, y 70 °C durante 60, 90, y 120 minutos. El tratamiento térmico

de la liraglutida se llevó a cabo en solución que tiene pH de alrededor de 8 y 10. Después del tratamiento térmico de la solución 2 se enfrió a 22 °C cuando después las dos soluciones fueron mezcladas y el pH se ajustó a 8.15 usando hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0.22 µm.

5 [0077] La estabilidad física de las preparaciones de liraglutida se evaluó mediante el uso de un método de fluorescencia; la prueba de Tioflavina T en la cual la tinta de tiazol histológica Tioflavina T (ThT) se usa como un indicador de formación de fibrilo. Mediante el uso de la prueba de Tioflavina T fue posible determinar la presencia de fibrilos en las diferentes formulaciones. El método se basó en las características fluorescentes de ThT. En la presencia de fibrilos, la fluorescencia de ThT exhibió una excitación máxima a 450 nm y mejoró la emisión en 482 nm. La intensidad de fluorescencia ThT se ha demostrado que es lineal con un incremento en la concentración del fibrilo.

10 [0078] La ThT se usó en una prueba de tensión aplicando las diferentes formulaciones en placas de microtitulador con ThT a 35 °C y se agitaron a 350 rpm hasta que las formulaciones fueron fibriladas. Se obtuvieron las gráficas de la intensidad de fluorescencia (FI) como una función del tiempo (seg). La variable respuesta fue; tiempo (segundos) hasta lograr una intensidad de fluorescencia de 400, por ejemplo, cuanto mayor es el tiempo para alcanzar FI = 400, más estable es una formulación.

15 Los resultados se representan en la figura 10.

Ejemplo 15

20 [0079] La solución 1 se preparó mediante disolución del conservante, agente isotónico, y solución amortiguadora en agua, el pH se ajustó a 7.9. En otro recipiente la solución 2 se preparó: la liraglutida se disolvió en agua caliente a 60-70°C y se mantuvo en un baño de agua a 50, 60, 65, y 70°C durante 30, 45, 150, y 180 minutos. El tratamiento térmico de la liraglutida se llevó a cabo en solución que tiene pH de alrededor de 8 y 10. Después del tratamiento térmico la solución 2 se enfrió a 22°C cuando después las dos soluciones fueron mezcladas y el pH se ajustó a 8.15 usando hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0.22 µm.

25 La estabilidad física de las preparaciones se evaluó mediante el uso de un método de fluorescencia como se describe en el ejemplo 14.

30 [0080] Las formulaciones como se describen anteriormente pueden incluir todos los agentes tensoactivos como se describen previamente en los ejemplos 8–15 y agentes tensoactivos como se describe anteriormente. Los agentes tensoactivos se disuelven en la solución 1 y posteriormente se incorporan con la solución 2 que resulta en una formulación final. En un aspecto de la invención los agentes tensoactivos pueden estar en concentraciones de 0-50 mg/ml.

Ejemplo 16

[0081] Tabla 1. Penfill® que contiene liraglutida fibrilada fue tratada térmicamente por 30 minutos a 85 °C.

35 El producto de fármaco de liraglutida recién producido tiene una turbidez de aproximadamente 0.2-1.0 NTU. Así, el tratamiento térmico del producto de fármaco de liraglutida altamente fibrilado puede disolver de otra manera estructuras de fibrilo muy estables.

Penfill antes de tratamiento térmico (NTU)	Penfill después de tratamiento térmico (NTU)
Aprox. 50 (promedio de 10 DP de penfill que contiene liraglutida fibrilada)	0.382
	0.182
	0.275
	0.174
	0.284
	0.356
	0.24
	0.326
	0.19
	0.836

[0082] La Figura 18 muestra el Penfill® tratado térmicamente a diferentes tiempos y temperaturas que fueron sometidos posteriormente a rotación.

[0083] Los ejemplos anteriores se pueden realizar individualmente o en combinación.

[0084] En un aspecto de la invención el procedimiento es como sigue:

5 Antes del secado por congelamiento la sustancia de fármaco de liraglutida se disuelve en agua caliente a 70-80°C en pH de alrededor de 8.0-10.0 a una concentración de 10-100 g/l. El tratamiento térmico se lleva a cabo durante 3-30 minutos. De aquí en adelante la sustancia de fármaco se seca por congelamiento. Posteriormente, la sustancia de fármaco secada por congelamiento se disuelve en agua caliente a 50-80°C por 30-180 minutos. La concentración es alrededor de 10-100 g/L y el pH de la solución (solución 2) es alrededor de 8-10. Otra solución (solución 1) se prepara por disolución de conservante, agente isotónico, y solución amortiguadora en agua. El pH se ajusta a 7.9. Las dos soluciones se mezclan y el pH se ajusta a 8.15 usando hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtra a través de un filtro de 0.22 µm. Ya sea antes o después de llenado en los sistemas cerrados de recipiente, el producto de fármaco de liraglutida que resulta se puede exponer a tratamiento térmico a 60-95 °C por 10-90 min.

15 **Ejemplo 17**

[0085] Uso de n-Dodecil-β-D-maltósido (DDM) y Zwittergent 3-10 en formulaciones que comprenden liraglutida: Las formulaciones F1, F2 y F3 fueron evaluadas. La estabilidad física de las formulaciones se evalúa por medio de una prueba de tensión acelerada.

20 La prueba de tensión se realiza como una prueba de rotación a 37°C. Se agregan 50µl de aire a 5 cartuchos (frascos de cristal de 3 ml) de cada formulación. Los cartuchos se rotan con una frecuencia de 30 rotaciones por minuto por 4 horas diariamente. La prueba se detiene después de 37 días de rotación. La inspección de los cartuchos se sigue diariamente o conforme se requiera. La turbidez de las formulaciones se caracteriza por medición nefelométrica de la turbidez en un HACH Turbidimeter 2100AN. La medición de la turbidez de un líquido se especifica en "Unidad de Turbidez Nefelométrica (NTU)". La inestabilidad física de la proteína se caracteriza por mediciones de turbidez alta.

Se realizaron los siguientes experimentos:

Ref: 6 mM liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, pH 7.7.

F1. 1.6 mM liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, 10 mM Zwittergent 3-10, pH 7.7.

30 F2. 1.6 mM liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, 10 mM DDM, pH 7.7.

F3. 1.6 mM liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, 25 mM DDM, pH 7.7.

Ejemplo 18

[0086] Después de 37 días en rotación a 37°C un Penfill® de cada formulación (F1, F2, y F3) se analizó con respecto a la cantidad total de liraglutida (Contenido, mg/ml) pureza (%), y la suma de impurezas (%) se midieron. Se realizaron los siguientes experimentos:

F1. 1.6 mM liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, 10 mM Zwittergent 3-10, pH 7.7.

F2. 1.6 mM liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, 10 mM DDM, pH 7.7.

F3. 1.6 mM liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, 40 mM de fenol, 8 mM de fosfato de sodio, 25 mM DDM, pH 7.7.

40

REIVINDICACIONES

1. Método para la preparación de una solución estable de un GLP-1(7-37) (SEC ID n.º 1), análogo insulínico de este y derivados insulínicos de este, método que comprende el calentamiento de una solución de dicho GLP-1 (7-37) (SEC ID n.º 1), análogo insulínico de este y derivados insulínicos de este, donde la temperatura está entre 50°C y 95°C , el pH está entre 8.0 y 10.5 y el calentamiento se continúa durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 180 minutos.
2. Método según la reivindicación 1, donde la temperatura está entre 60 °C y 95 °C.
3. Método según la reivindicación 1, donde la temperatura está entre 50 °C y 80 °C.
4. Método según la reivindicación 1, donde la temperatura está entre 70 °C y 80 °C.
5. Método según la reivindicación 1, donde la temperatura está entre 60 °C y 80 °C.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el pH está entre de 8.0 hasta 10.0.
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el pH está entre de 8.0 hasta 9.7.
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el pH está entre de 8.0 hasta 8.5.
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el pH es 8.15
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el calentamiento se continúa por un período de tiempo que está entre 15 minutos y 120 minutos.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el calentamiento se continúa por un período de tiempo que está entre 10 minutos y 90 minutos.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el calentamiento se continúa por un período de tiempo que está entre 3 minutos y 30 minutos.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque el calentamiento se continúa por un período de tiempo el cual está entre 5 minutos y 15 minutos.
14. Método para la preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un GLP-1(7-37) (SEC ID n.º 1), análogo insulínico de este y derivados insulínicos de este, método que comprende un producto de péptido a granel que se ha producido según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 seguido de un secado por congelamiento de la solución o suspensión de dicho GLP-1(7-37) (SEC ID n.º 1), análogo insulínico de este y derivados insulínicos de este.
15. Método para la preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un GLP-1(7-37) (SEC ID n.º 1), análogo insulínico de este y derivados insulínicos de este, método que comprende que la composición farmacéutica se prepare a partir de un producto secado por congelamiento según la reivindicación 14 seguido de uno o más métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
16. Método según la reivindicación 15, que se lleva a cabo bien antes del llenado en un sistema de administración final o bien después del llenado en un sistema de administración final o ambos.
17. Método para la preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un GLP-1 (7-37) (SEC ID n.º 1), análogo insulínico de este y derivados insulínicos de este, método que comprende los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1-16 seguidos de la adición de los otros excipientes farmacéuticamente aceptables.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde dicho GLP-1 (7-37) (SEC ID n.º 1), análogo insulínico de este y derivados insulínicos de este es Arg³⁴, Lys²⁶(Nε-(γ-Glu(Nα-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37).
19. Solución estable de un GLP-1 (7-37) (SEC ID n.º 1), análogo insulínico de este y derivados insulínicos de este obtenibles por métodos según las reivindicaciones 1-13 o 18.
20. Uso de una solución estable de GLP-1 (7-37) (SEC ID n.º 1), análogo insulínico de este y derivados insulínicos de este de la reivindicación 19 para la preparación de una composición farmacéutica estable al almacenamiento.
21. Composición estable al almacenamiento de GLP-1 (7-37) (SEC ID n.º 1), análogo insulínico de este y derivados insulínicos de este obtenible por métodos según las reivindicaciones 1-18.

Figura 1

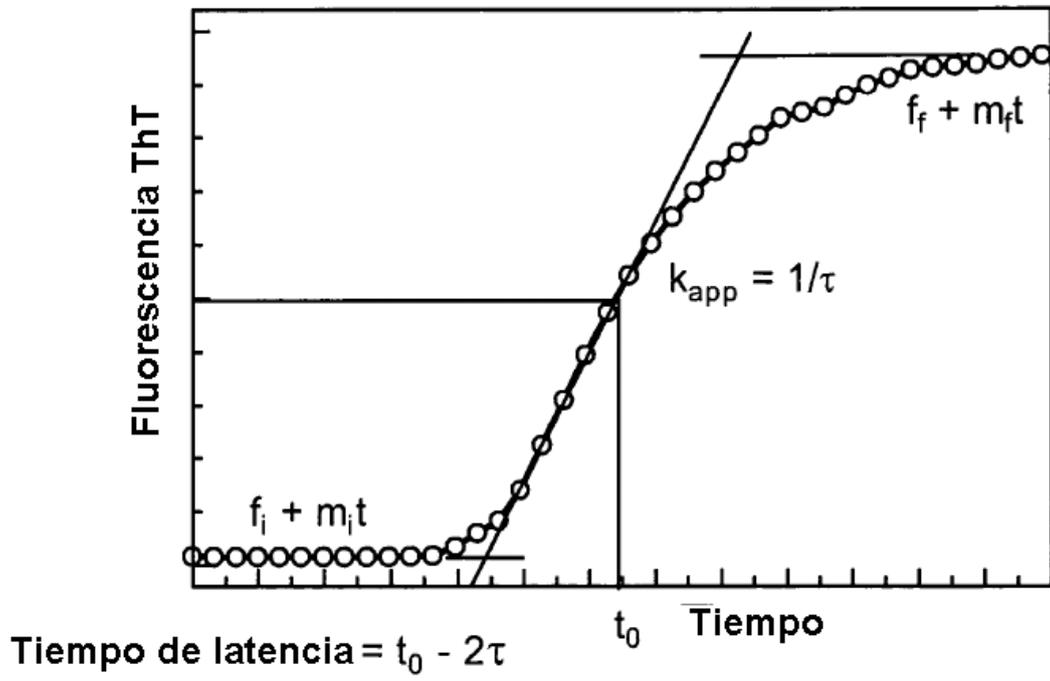


Figura 2

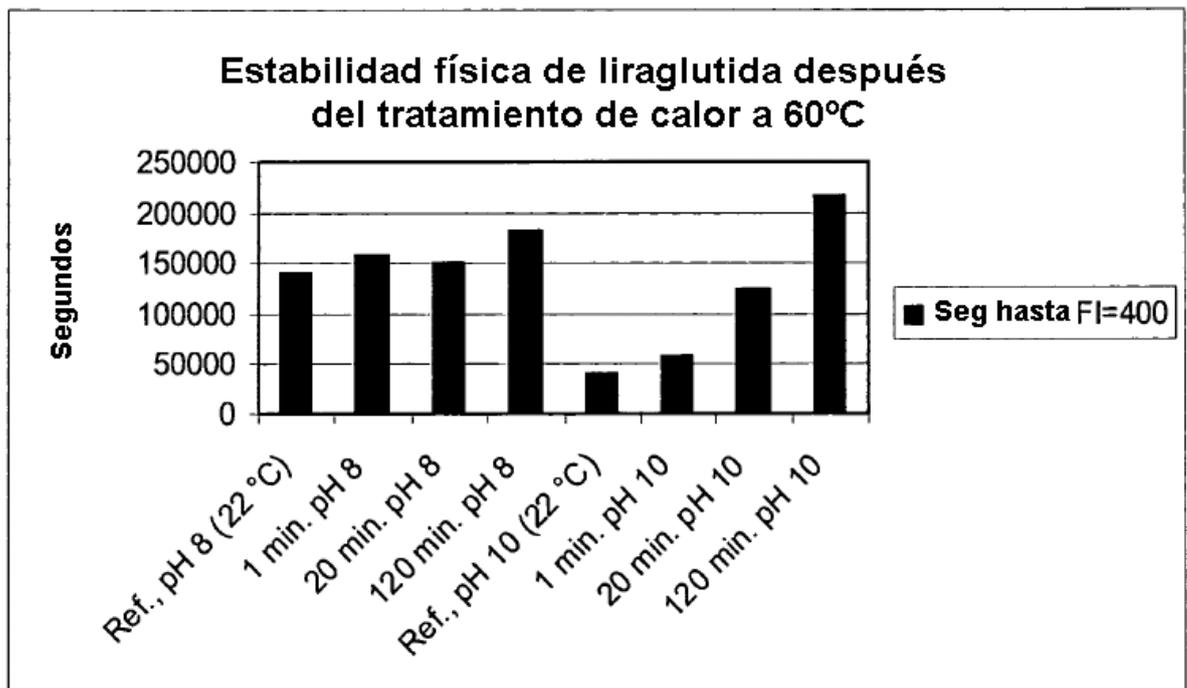


Figura 3

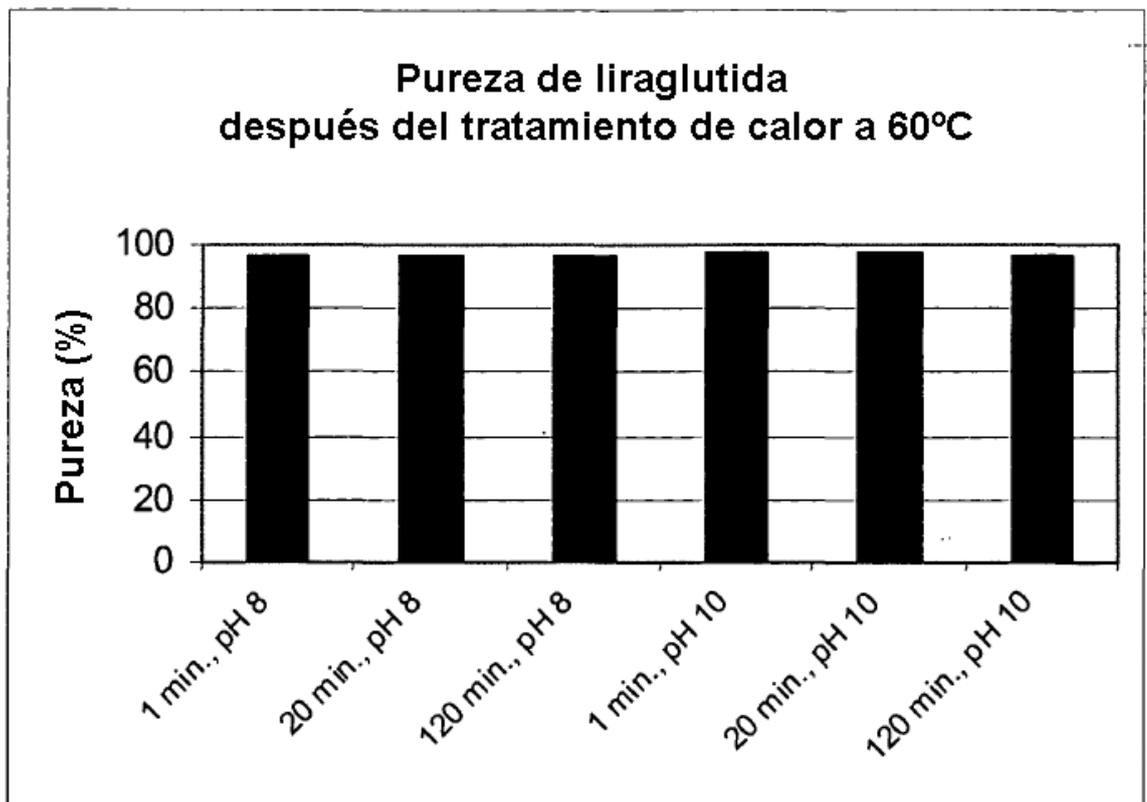


Figura 4

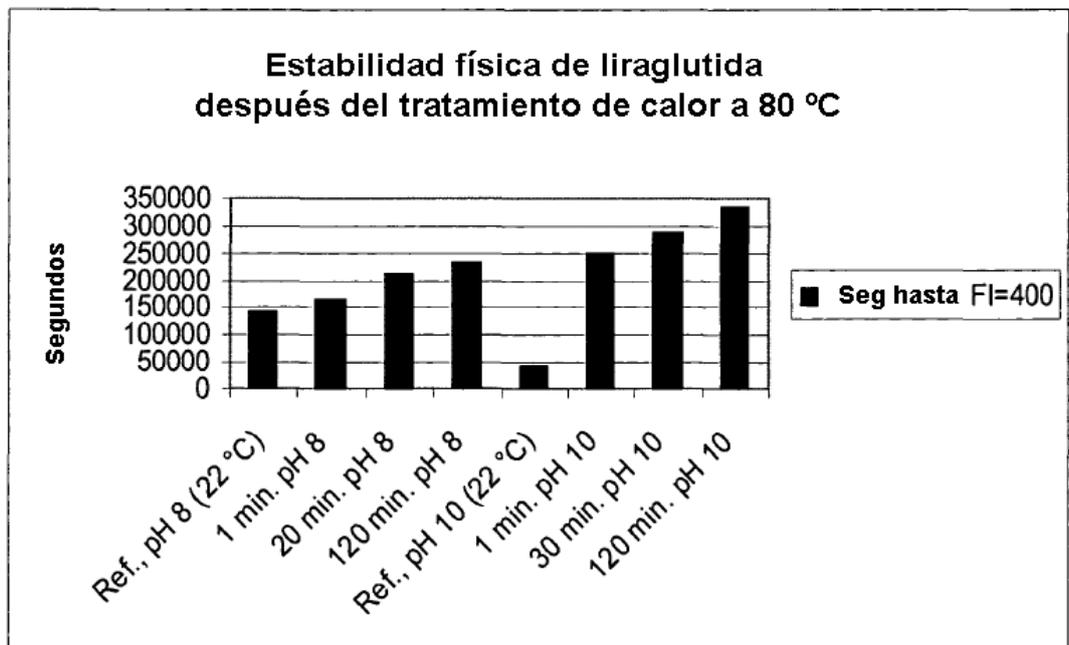


Figura 5.

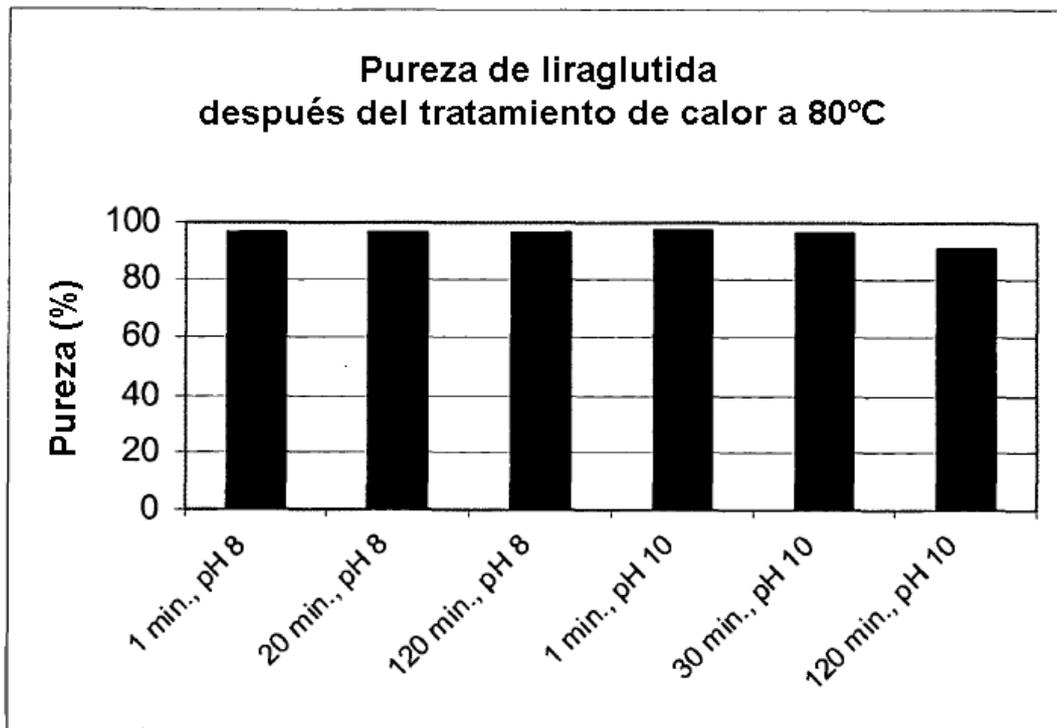


Figura 6

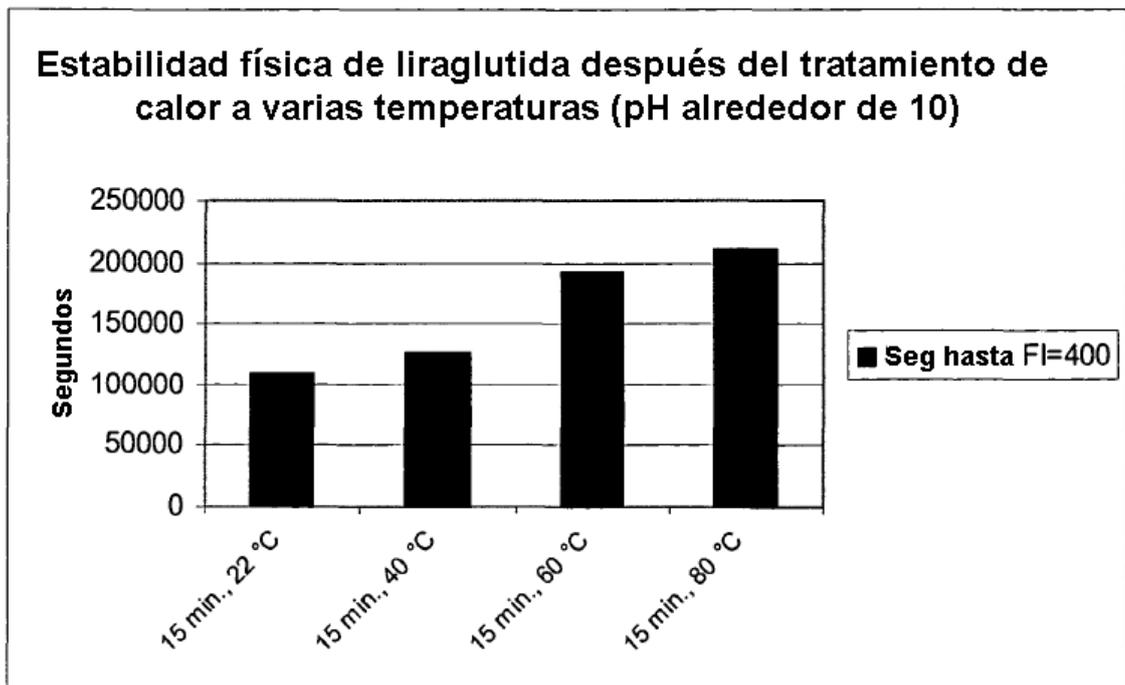


Figura 7

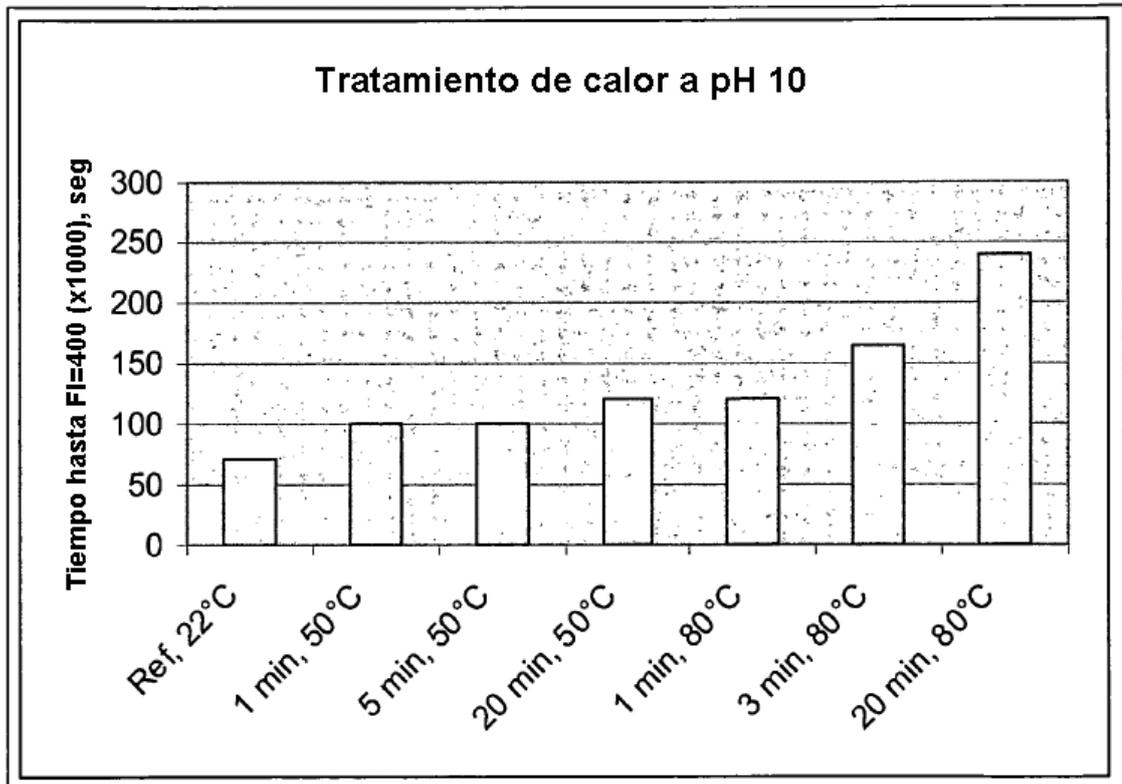


Figura 8

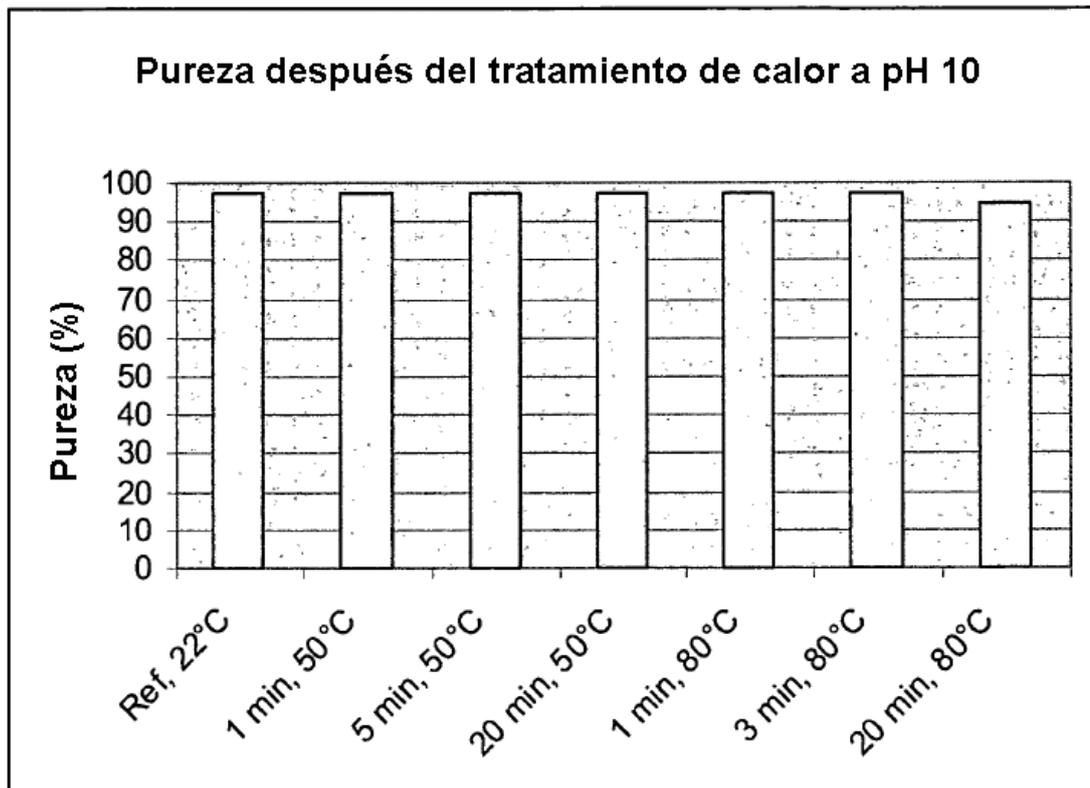


Figura 9

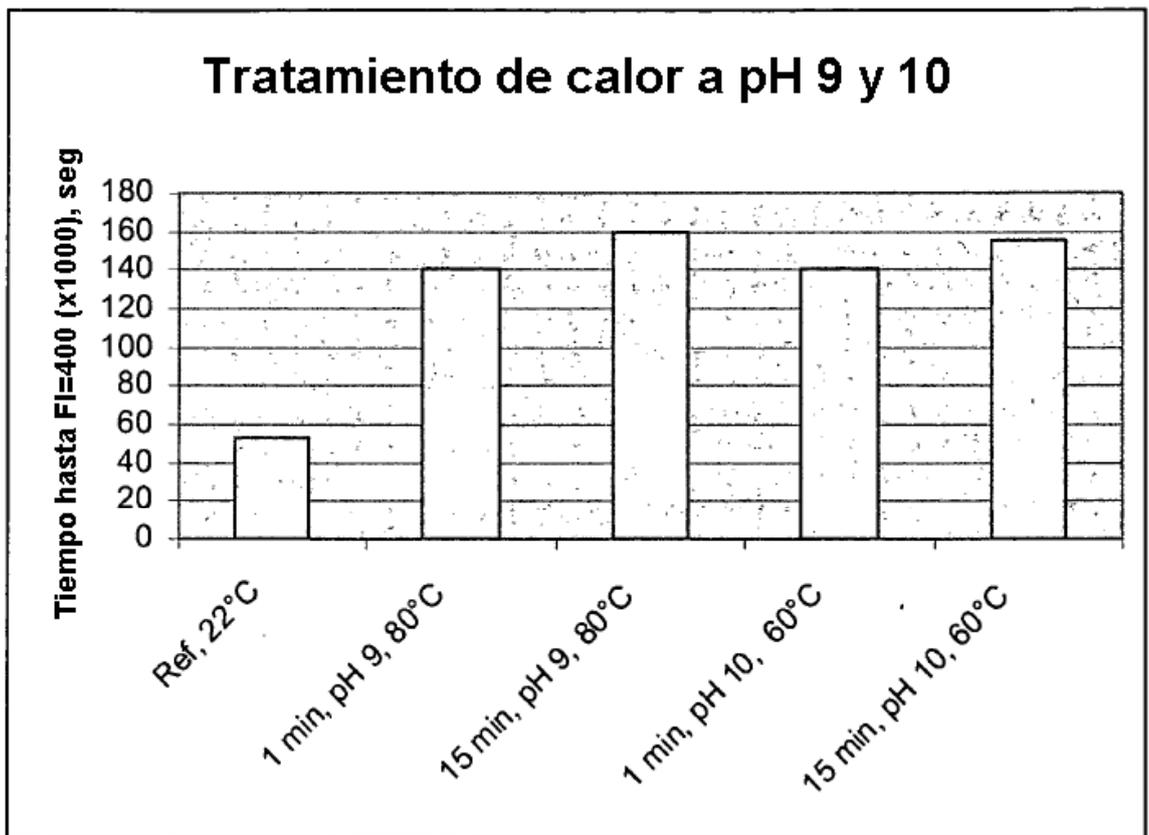


Figura 10

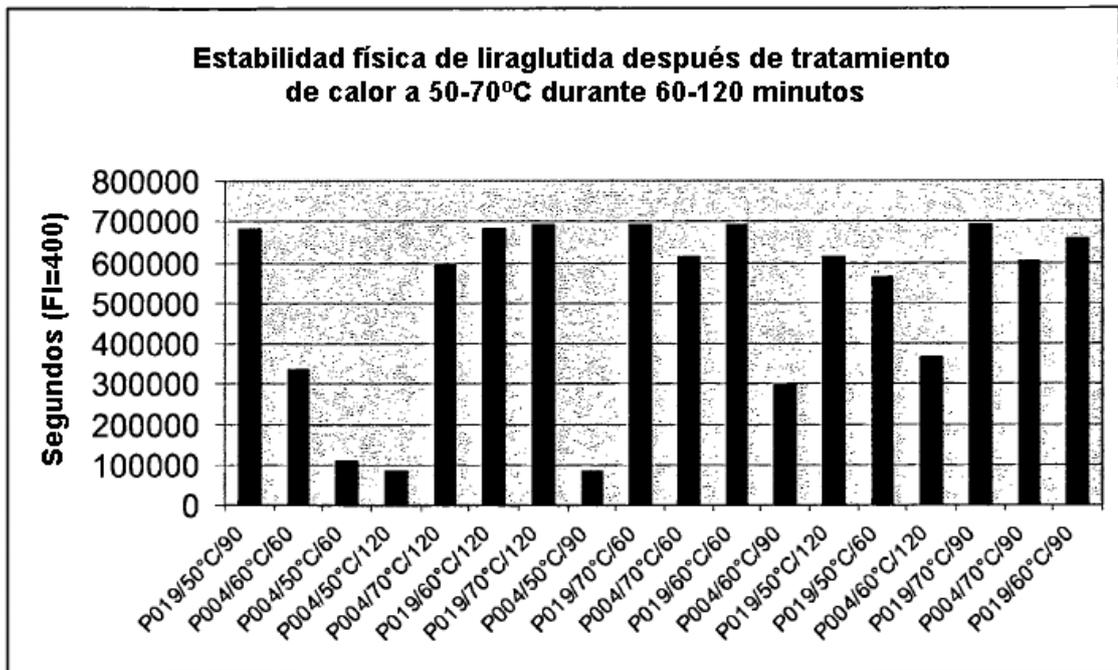


Figura 11

