

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 533**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/26** (2006.01)

**A61K 47/10** (2007.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2005 E 12153063 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2494983**

54 Título: **Formulaciones estables de GLP-1**

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:

**19.12.2019**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)**

**Novo Allé**

**2880 Bagsværd, 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:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 735 533 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 GLP-1

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas. Más específicamente, la invención se refiere a formulaciones farmacéuticas estables en almacenamiento que comprenden un péptido insulínico.

## 10 Antecedentes de la invención

Los péptidos terapéuticos se usan ampliamente en la práctica médica. Las composiciones farmacéuticas de tales péptidos terapéuticos deben tener una vida útil de varios años para ser adecuadas para el uso común. Sin embargo, las composiciones de péptidos son inherentemente inestables debido a la sensibilidad hacia la degradación química y física. La degradación química implica un cambio en los enlaces covalentes, como oxidación, hidrólisis, racemización o entrecruzamiento. La degradación física implica cambios conformacionales con relación a la estructura nativa del péptido, lo que puede conducir a la agregación, precipitación o adsorción a superficies.

El glucagón se ha usado durante décadas en la práctica médica para la diabetes y se desarrollan varios péptidos similares al glucagón para diversas indicaciones terapéuticas. El gen del preproglucagón codifica el glucagón, así como también el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y el péptido 2 similar al glucagón (GLP-2). Los análogos y derivados de GLP-1, así como también el péptido homólogo de lagarto, exendina-4, se desarrollan para el tratamiento de la hiperglicemia en la diabetes tipo 2. Los GLP-2 son potencialmente útiles en el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales. Sin embargo, todos estos péptidos que abarcan 29-39 aminoácidos tienen un alto grado de homología y comparten una serie de propiedades, notablemente su tendencia a agregar y formar fibrillas insolubles. Esta propiedad parece abarcar una transición de una conformación de hélice alfa predominante a hojas beta (Blundell TL (1983) The conformation of glucagon. En: Lefévre PJ (Ed) Glucagon I. Springer Verlag, pp 37-55, Senderoff RI y otros, J. Pharm. Sci. 87 (1998) 183-189, WO 01/55213). La agregación de los péptidos similares al glucagón se observa principalmente cuando las soluciones de los péptidos se agitan o se remueven, en la interfaz entre la solución y la fase gaseosa (aire), y en contacto con superficies hidrofóbicas tal como Teflon®.

El documento núm. WO 01/77141 describe el tratamiento térmico de Arg<sup>34</sup>-GLP-1 (7-37) a temperaturas elevadas durante menos de 30 segundos. El documento núm. WO 04/55213 describe la microfiltración de Arg<sup>34</sup>-GLP-1 (7-37) a pH 9,5. El documento núm. WO 01/55213 describe el tratamiento de Val<sup>8</sup>-GLP-1 (7-37) a pH 12,3 durante 10 minutos a temperatura ambiente. El documento núm. WO 03/35099 describe la preparación de cristales de zinc de GLP-1 a pH alcalino.

Por lo tanto, se deben aplicar a menudo varios tratamientos y adición de excipientes a las composiciones farmacéuticas de los péptidos similares al glucagón para mejorar su estabilidad. La vida útil de las formulaciones parenterales líquidas de estos péptidos debe ser de al menos un año, preferentemente más. El período de uso donde el producto puede transportarse y agitarse diariamente a temperatura ambiente preferentemente debe ser de varias semanas. Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones farmacéuticas de péptidos similares al glucagón que tengan una estabilidad mejorada.

## 45 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Ambas muestras contienen una formulación de 1,2 mM de liraglutida, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, NaCl 10 mM, pH 7,7. Se añade poloxámero-188 a una concentración final de 200 ppm en una muestra.

50 Figura 2. Todas las muestras contienen liraglutida 1,67 mM, 58 mM de fenol, 14 mg/ml de propilenglicol, 8 mM de fosfato de sodio, pH 7,7. Se añade poloxámero 188 a dos muestras.

Figura 3. Ambas muestras contienen 1,2 mM de liraglutida, 40 mM de fenol, 14 mg/ml de propilenglicol, 10 mM de NaCl, pH 7,7. Se añade polisorbato 20 a una muestra

55 Figura 4. Medición de NTU en función del tiempo durante una prueba de rotación de las composiciones de liraglutida sin tensioactivo (F1) y con tensioactivo (F2 y F3).

Figura 5. Medición de la fluorescencia ThT en función del tiempo durante una prueba de rotación de las composiciones de liraglutida sin tensioactivo (F1) y con tensioactivo (F2). La curva inferior es la traza de F2.

Figura 6. Curso de tiempo para la formación de las fibrillas.

Figura 7. Estabilidad física de liraglutida preparada por tratamiento térmico a 60 °C.

65 Figura 8. Pureza de liraglutida después del tratamiento térmico a 60 °C.

Figura 9. Estabilidad física de liraglutida preparada por tratamiento térmico a 80 °C.

Figura 10. Pureza de liraglutida después del tratamiento térmico a 80 °C.

5 Figura 11. Estabilidad física de liraglutida preparada por 15 minutos de tratamiento térmico a 22, 40, 60 y 80 °C.

Figura 12. Estabilidad física de liraglutida preparada por tratamiento térmico a 50 y 80 °C a pH 10.

Figura 13. Pureza de liraglutida después del tratamiento térmico a 50 y 80 °C a pH 10.

10

Figura 14. Estabilidad física de liraglutida preparada por tratamiento térmico a 60 y 80 °C a pH 9 y 10.

Figura 15. Esta figura muestra 5 formulaciones diferentes. 4 formulaciones diferentes que contienen diversas cantidades de Solutol HS-15 en tampón fosfato o tricina. Una formulación (Formulación Ref.) es liraglutida en tampón fosfato sin tensioactivo.

15

Figura 16. Esta figura muestra 5 formulaciones diferentes. 4 formulaciones diferentes que contienen varias cantidades de Pluronic F-127 en tampón fosfato o tricina. Una formulación (Formulación Ref.) es liraglutida en tampón fosfato sin tensioactivo.

20

Figura 17. Estabilidad física de liraglutida después del tratamiento térmico a 50-70 °C durante 60-120 minutos.

Figura 18. Penfill® se trató térmicamente a diferentes tiempos y temperaturas que posteriormente se sometieron a rotación.

25

Figura 19. Estabilidad de las formulaciones que contienen diferentes excipientes.

Figura 20: Prueba de rotación de Penfill® de las formulaciones que contienen diferentes excipientes.

30 Breve descripción de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de un derivado insulínico de GLP-1 (7-37), método que comprende calentar una solución de dicho derivado insulínico, en donde la temperatura está entre 50 °C y 85 °C, el pH está entre 8,0 y 10,5 y dicho calentamiento se continúa durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 180 minutos. En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un derivado insulínico estable de GLP-1 (7-37), método que comprende que se produzca un producto peptídico a volumen mediante el procedimiento tal como se define en la presente descripción seguido por liofilización de la solución o suspensión de dicho derivado insulínico. En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un derivado insulínico de GLP-1 (7-37), método que comprende que la composición farmacéutica se prepare a partir de un producto liofilizado como se define en la presente descripción seguido por uno o más de los métodos como se definen en la presente descripción. En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un derivado insulínico de GLP-1 (7-37), método que comprende los métodos como se definen en la presente descripción seguido de la adición de excipientes farmacéuticamente aceptables.

35

40

45

Descripción

La siguiente es una definición detallada de los términos usados en la descripción.

50

El término "cantidad efectiva", como se usa en la presente descripción, significa una dosis que es suficiente para ser efectiva para el tratamiento del paciente en comparación con ningún tratamiento.

El término "medicamento" como se usa en la presente descripción significa una composición farmacéutica adecuada para la administración de los compuestos farmacéuticamente activos a un paciente.

55

El término "composición farmacéutica" como se usa en la presente descripción significa un producto que comprende un compuesto activo o una sal del mismo junto con excipientes farmacéuticos tales como tampón, conservante y modificador de tonicidad, siendo dicha composición farmacéutica útil para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno por administración de dicha composición farmacéutica a una persona. Por lo tanto, una composición farmacéutica se conoce también en la técnica como una formulación farmacéutica. Debe entenderse que el pH de una composición farmacéutica que debe reconstituirse es el valor de pH que se mide en la composición reconstituida producida por reconstitución en el líquido de reconstitución prescrito a temperatura ambiente.

60

La expresión "composición farmacéutica estable en almacenamiento" como se usa en la presente descripción significa una composición farmacéutica que es estable durante al menos el período que se requiere por las agencias

65

reguladoras en relación con las proteínas terapéuticas. Preferentemente, una composición farmacéutica estable en almacenamiento es estable durante al menos un año a 5 °C. La estabilidad incluye la estabilidad química así como también la estabilidad física.

5 El término "solución estable" como se usa en la presente descripción significa una preparación de un compuesto que se usa como productos intermedios en la preparación de composiciones farmacéuticas estables en almacenamiento como se describió anteriormente.

El término "aceptable farmacéuticamente" como se usa en la presente descripción significa adecuado para las aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, que no produce eventos adversos en los pacientes, etcétera.

10 El término "tampón", como se usa en la presente descripción, 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 ocurriría de otra manera debido a reacciones químicas. Los tampones incluyen sustancias químicas tales como fosfato de sodio, TRIS, glicina y citrato de sodio.

15 El término "conservante" como se usa en la presente descripción se refiere a un compuesto químico que se añade a una composición farmacéutica para prevenir o retrasar la actividad microbiana (crecimiento y metabolismo). Los ejemplos de conservantes farmacéuticamente aceptables son fenol, m-cresol y una mezcla de fenol y m-cresol.

20 El término "agente de isotonicidad", como se usa, se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que sirve para modificar la presión osmótica de la composición farmacéutica, de manera que la presión osmótica se acerque más a la del plasma humano. Los agentes de isotonicidad incluyen NaCl, glicerol, manitol, etc.

25 El término "estabilizador", como se usa en la presente descripción, se refiere a sustancias químicas añadidas a composiciones farmacéuticas que contienen péptidos para estabilizar el péptido, es decir, para aumentar la vida útil y/o el tiempo de uso de tales composiciones. Los ejemplos de estabilizadores usados en las formulaciones farmacéuticas son L-glicina, L-histidina, arginina, polietilenglicol y carboximetilcelulosa.

30 El término "Tensioactivo" como se usa en la presente descripción se refiere a cualesquiera moléculas o iones que se comprenden de una parte soluble en agua (hidrofílica), la cabeza, y un segmento soluble en grasa (lipofílico). Los tensioactivos se acumulan preferentemente en las interfaces, en las que la parte hidrofílica se orienta hacia el agua (fase hidrofílica) y la parte lipofílica hacia la fase oleosa o hidrofóbica (es decir, vidrio, aire, aceite, etcétera). La concentración a la que los tensioactivos comienzan a formar micelas se conoce como la concentración micelar crítica o CMC. Además, los tensioactivos disminuyen la tensión superficial de un líquido. Los tensioactivos se conocen, además, como compuestos anfipáticos. El término "Detergente" es un sinónimo usado para tensioactivos en general.

35 Los tensioactivos aniónicos pueden seleccionarse del grupo de: Ácido quenodesoxicólico, sal sódica del ácido quenodesoxicólico, ácido cólico, ácido deshídrocólico, ácido desoxicólico, éster metílico del ácido desoxicólico, digitonina, digitoxigenina, N-óxido de N,N-dimetildodecilamina, docusato de sodio, ácido glicoquenodesoxicólico sodio, hidrato del ácido glicólico, ácido monohidrato glicodesoxicólico, sal sódica del ácido glicodesoxicólico, sal sódica del ácido glicodesoxicólico, sal disódica 3-sulfato del ácido glicolítico, éster etílico del ácido glicolítico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, sal sódica de N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, litio dodecil sulfato, lugol, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, 1-butanossulfonato de sodio, 1-decanossulfonato de sodio, 1-dodecanossulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-nonanosulfonato de sodio, 1-propanossulfonato de sodio monohidratado, 2-bromoetanosulfonato de sodio, hidrato colato de sodio, bilis de buey o de oveja, hidrato colato de sodio, colato de sodio, desoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio, dodecil sulfato de sodio, hexanosulfonato de sodio, octil sulfato de sodio, pentanosulfonato de sodio, taurocolato de sodio, sal sódica del ácido tauroquenodesoxicólico, sal sódica del ácido taurodesoxicólico monohidratado, sal disódica 3-sulfato del ácido tauroglicolítico, sal sódica del ácido taurodesoxicólico, dodecilsulfato de Trizma®, DSS (docusato de sodio, CAS registro núm. [577-11-7]), docusato de calcio, CAS registro núm. [128-49-4]), docusato de potasio, CAS registro núm. [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio), dodecilsulfato de sodio (FOS-colina-12), decilsulfato de sodio (FOS-colina-10), nonilsulfato de sodio (FOS-colina-9), ácido dipalmitoilfosfatídico, caprilato de sodio y/o ácido ursodesoxicólico.

55 Los tensioactivos catiónicos pueden seleccionarse del grupo de: Bromuro de alquiltrimetilamoniocloruro de benzalconio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, cloruro de bencildimetiltetradecilamonio, tetrachloroiodato 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.

60 Los tensioactivos no iónicos pueden seleccionarse del grupo de: BigCHAP, Bis (polietilenglicol bis [imidazoil carbonilo]), copolímeros en bloque como copolímeros en bloque de polietileno óxido / polipropileno óxido tal como poloxámeros, poloxámero 188 y poloxámero 407, Brij® 35, Brij® 56, Brij® 72, Brij® 76, Brij® 92V, Brij® 97, Brij® 58P, Cremophor® EL, Decaetileno glicol monododecil éter, N-Decanoil-N-metilglucamina, n-Dodecanoil-N-metilglucamida, alquil-poliglucósidos, aceite de castor etoxilado, Heptaetileno glicolmonododecil éter, Heptaetileno glicol monododecil

5 éter, Heptaetileno glicolmonotetradecil éter, Hexaetileno glicol monododecil éter, Hexaetileno glicol monohexadecil éter, Hexaetileno glicol monooctadecil éter, Hexaetileno glicol monotetradecil éter, Igepal CA-630, Igepal CA-630, Metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-beta-D-glucopiranosido, Nonaetileno glicol monododecil éter, N-Nonanoil-N-metilglucamina, N-Nonanoil-N-metilglucamina, Octaetileno glicol monododecil éter, Octaetileno glicol monododecil éter, Octaetileno glicol monohexadecil éter, Octaetileno glicol monooctadecil éter, Octaetileno glicol monotetradecil éter, Octil-β-D-glucopyranoside, Pentaetileno glicol monododecil éter, Pentaetileno glicol monododecil éter, Pentaetileno glicol monohexadecil éter, Pentaetileno glicol monohexil éter, Pentaetileno glicol monooctadecil éter, Pentaetileno glicol monooctadecil éter, Polietileno glicol diglicidil éter, Polietileno glicol éter W-1, Polioxietileno 10 tridecil éter, Polioxietileno 100 estearato, Polioxietileno 20 isohexadecil éter, Polioxietileno 20 oleyl éter, Polioxietileno 40 estearato, Polioxietileno 50 estearato, Polioxietileno 8 estearato, Polioxietileno bis(imidazolil carbonil), Polioxietileno 25 propileno glicol estearato, 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-β-D-maltósido, Tetraetileno glicol monododecil éter, Tetraetileno glicol monododecil éter, Tetraetileno glicol monotetradecil éter, Trietileno glicol monododecil éter, Trietileno glicol monododecil éter, Trietileno glicol monohexadecil éter, Trietileno glicol monooctadecil éter, Trietileno glicol monotetradecil éter, 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, solución de Triton® X-165, solución de Triton® X-305, 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, gangliósidos), fosfolípidos, y/o n-Undecil β-D-glucopiranosido. '

25 Los tensioactivos zwitteriónicos se pueden seleccionar del grupo de: CHAPS, CHAPSO, 3- (Dodildimetilamonio) propanosulfonato de sal interna, 3-(Dodecildimetilamonio) -propanosulfonato de sal interna, 3- (Dodecildimetilamonio) propanosulfonato de sal interna, 3- (N,N-Dimetilmiristilamonio) propansulfonato, 3- Dimetiloctadecilamonio) -propanosulfonato, 3- (N, N-Dimetil-octilamonio) propanosulfonato sal interna, 3- (N, N-Dimetil-palmitilamonio) propanosulfonato, N-alkuil-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 (3- (Decildimetilamonio) -propanosulfonato sal interna), Zwittergent 3-08 (3- (Octildimetilamonio) pro-panosulfonato), glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas y fosfatidil serina ), gliceroglicolípidos (galactopiranosido), alquilo, alcoxilo (éster alquílico), alcoxi (alquil éter) - derivados de lisofosfatidilo y fosfatidilcolinas, por ejemplo, derivados de lauroilo y miristoilo de la lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, que es colina

35 etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, acilcarnitinas y derivados, derivados N<sup>beta</sup> acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de la cadena lateral de lisina o arginina, derivados N<sup>beta</sup> acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N<sup>beta</sup> acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, o el tensioactivo puede seleccionarse del grupo de derivados de imidazolina, ácidos grasos de cadena larga y sus sales C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), N-hexadecil-N, N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (por ejemplo, ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina), o mezclas de los mismos.

45 El término "alquilpoliglucósidos" como se usa en la presente descripción se refiere a una cadena C<sub>5</sub>-20-alquilo, -alquenilo o -alquinilo lineal o ramificada que se sustituye por una o más porciones de glucósido tales como maltósido, sacárido, etcétera. Las modalidades de estos alquilpoliglucósidos incluyen C<sub>6-18</sub>-alquilpoliglucósidos. Las modalidades específicas de estos alquilpoliglucósidos incluyen las cadenas de número par de carbono, tales como las cadenas alquilo C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub> y C<sub>20</sub>. Las modalidades específicas de las porciones de glucósido incluyen piranosido, glucopiranosido, maltósido, maltotriósido y sacarosa. En modalidades de la invención, menos de 6 porciones de glucósido se unen al grupo alquilo. En modalidades de la invención, menos de 5 porciones de glucósido se unen al grupo alquilo. En modalidades de la invención, menos de 4 porciones de glucósido se unen al grupo alquilo. En modalidades de la invención, menos de 3 porciones de glucósido se unen al grupo alquilo. En modalidades de la invención, menos de 2 porciones de glucósido se unen al grupo alquilo. Modalidades específicas de alquilpoliglucósidos son alquil-glucósidos como n-decil β-D-glucopiranosido, decil β-D-maltopiranosido, dodecil β-D-glucopiranosido, n-dodecil β-D-maltósido, n-dodecil β-D-maltósido, n-dodecil β-D-maltósido, tetradecil β-D-glucopiranosido, 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.

60 El término "tratamiento de una enfermedad" como se usa en la presente descripción significa el manejo y cuidado de un paciente que tiene desarrollado la enfermedad, afección o trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, afección o trastorno. El tratamiento incluye la administración del compuesto activo para eliminar o controlar la enfermedad, afección o trastorno así como también para aliviar los síntomas o complicaciones asociados con la enfermedad, afección o trastorno, y la prevención de la enfermedad, afección o trastorno.

65

El término "prevención de una enfermedad", como se usa en la presente descripción, se define como el manejo y cuidado de un individuo en riesgo de desarrollar la enfermedad antes de la aparición clínica de la enfermedad. El propósito de la prevención es combatir el desarrollo de la enfermedad, afección o trastorno, e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas o complicaciones y para prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades, afecciones o trastornos relacionados.

El término "análogo" como se usa en la presente descripción con referencia a un péptido significa un péptido modificado en donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido se han sustituido por otros residuos de aminoácidos y/o en donde uno o más residuos de aminoácidos se han eliminado del péptido y/o en donde uno o más residuos de aminoácidos se han eliminado del péptido en donde uno o más residuos de aminoácidos se ha agregado al péptido. Dicha adición o deleción de residuos de aminoácido puede tener lugar en el N-terminal del péptido y/o en el C-terminal del péptido. En una modalidad, un análogo comprende menos de 6 modificaciones (sustituciones, eliminaciones, adiciones) con relación al péptido nativo. En otra modalidad, un análogo comprende menos de 5 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) con relación al péptido nativo. En otra modalidad, un análogo comprende menos de 4 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) con relación al péptido nativo. En otra modalidad, un análogo comprende menos de 3 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) con relación al péptido nativo. En otra modalidad, un análogo comprende menos de 2 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) con relación al péptido nativo. En otra modalidad, un análogo comprende solo una única modificación (sustituciones, deleciones, adiciones) con relación al péptido nativo.

El término "derivado" como se usa en la presente descripción en relación con un péptido parental significa una proteína parental modificada químicamente o un análogo de la misma, en donde al menos un sustituyente no está presente en la proteína parental o un análogo de la misma, es decir, una proteína parental que ha sido covalentemente modificada. Las modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres, PEGilaciones y similares.

El término "compuesto GLP-1", como se usa en la presente descripción, significa GLP-1 (7-37) (SEC ID NO. 1), su análogo insulínico y sus derivados insulínicos. Los ejemplos no limitantes de análogos de GLP-1 son GLP-1 (7-36) amida, Arg<sup>34</sup>-GLP-1 (7-37), Gly<sup>8</sup>-GLP-1 (7-37), Val<sup>8</sup>-GLP-1 (7-36) -amida y Val<sup>8</sup>Asp<sup>22</sup>-GLP-1 (7-37). Los ejemplos no limitantes de derivados de GLP-1 son desamino-His<sup>7</sup>, Arg<sup>26</sup>Lys<sup>34</sup>(N<sup>ε</sup>- (γ-Glu (N<sup>α</sup>-hexadecanoil))) - GLP-1 (7-37), desamino-His<sup>7</sup>, Arg<sup>26</sup>Lys<sup>34</sup>(N<sup>ε</sup>-octanoil) -GLP-1 (7-37), Arg<sup>26,34</sup>Lys<sup>38</sup>(N<sup>ε</sup>- (ω-carboxicarboxipentadecanoil)) - GLP-1 (7-38), Arg<sup>26,34</sup>Lys<sup>36</sup>(N<sup>ε</sup>- (γ-Glu (N<sup>α</sup>-hexadecanoil))) - GLP-1 (7-36) y Arg<sup>34</sup>Lys<sup>26</sup>(N<sup>ε</sup>- (γ-Glu (N<sup>α</sup>-hexadecanoil))) - GLP-1 (7-37).

El término "dipeptidil aminopeptidasa IV protegido" como se usa en la presente descripción significa un compuesto, por ejemplo, un análogo de GLP-1, que 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 a la degradación por la dipeptidil aminopeptidasa IV se determina mediante el ensayo de degradación siguiente:

Se incuban alícuotas del compuesto GLP-1 (5 nmol) a 37 °C con 1 μl de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada, correspondiente a una actividad enzimática de 5 mU durante 10-180 minutos en 100 μl de tampón trietilamina-HCl 0,1 M, pH 7,4. Las reacciones enzimáticas se terminan mediante la adición de 5 μl de ácido trifluoroacético al 10 %, y los productos de degradación peptídica se separan y cuantifican mediante el uso de análisis por HPLC. Un método para realizar este análisis es: Las mezclas se aplican sobre una columna Vydac C18 de poro ancho (poros de 30 nm, partículas de 5 μm) de 250×4,6 mm y se eluyen a una velocidad de flujo de 1 ml/min con gradientes lineales, en etapas, de acetonitrilo en 0,1 % de ácido trifluoroacético (0 % de acetonitrilo durante 3 minutos, 0-24 % de acetonitrilo durante 17 minutos, 24-48 % de acetonitrilo durante 1 minuto) de acuerdo con Siegel y otros, Regul. Pept. 1999;79:93-102 y Mentlein y otros Eur. J. Biochem. 1993;214:829-35. Los péptidos y sus productos de degradación pueden monitorearse mediante su absorbancia a 220 nm (enlaces peptídicos) o a 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican mediante la integración de las áreas de sus picos con relación a las de los estándares. La velocidad de hidrólisis de un compuesto GLP-1 por la dipeptidil aminopeptidasa IV se estima a tiempos de incubación que resulten en menos del 10 % de hidrólisis del compuesto GLP-1.

El término "insulínico", como se usa en la presente descripción que se refiere a un péptido o un compuesto, significa la capacidad de estimular la secreción de insulina en respuesta a un aumento del nivel de glucosa en plasma. Los péptidos y compuestos insulínicos son agonistas del receptor GLP-1. La propiedad insulínica de un compuesto puede determinarse mediante ensayos in vivo o in vitro conocidos en la técnica. El siguiente ensayo in vitro se puede usar para determinar la naturaleza insulínica de un compuesto tal como un péptido. Preferentemente los compuestos insulínicos exhiben un valor de EC<sub>50</sub> en el ensayo a continuación de menos de 5 nM, incluso con mayor preferencia valores de EC<sub>50</sub> menores de 500 pM.

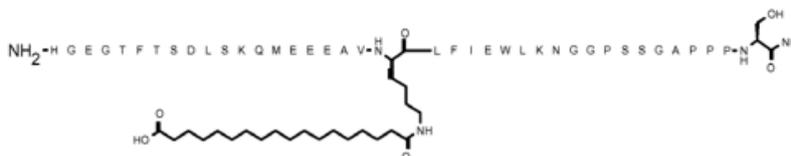
Las células de riñón de hámster bebé (BHK) que expresan el receptor del GLP-1 humano clonado (BHK 467-12A) se cultivaron en medio DMEM con la adición de 100 IU/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomina, suero fetal de ternera al 10 % y 1 mg/ml de Geneticina G-418 (Life Technologies). Las membranas plasmáticas se preparan por homogeneización en tampón (Tris-HCl 10 mM, NaCl 30 mM y ditiotretol 1 mM, pH 7,4, que contiene, además, 5 mg/ml de leupeptina (Sigma), 5 mg/l de pepstatina (Sigma), 100 mg/l de bacitracina (Sigma), y 16 mg/l de aprotinina (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA)). El homogeneizado se centrifugó sobre una capa de 41 % de sacarosa

W7v. La banda blanca entre las dos capas se diluyó en tampón y se centrifugó. Las membranas plasmáticas se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

- 5 El ensayo del receptor funcional se lleva a cabo mediante la medición del AMPc como una respuesta a la estimulación por el péptido insulínico o el compuesto insulínico. Las incubaciones se llevan a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de 140 µl y con las siguientes concentraciones finales: Tris-HCl 50 mM, EGTA 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM, ATP 1,7 mM, GTP 20 mM, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 2 mM, Tween-20 al 0,01 % p/v, pH 7.4. Los compuestos se disuelven y se diluyen en tampón. El GTP se prepara en el momento para cada experimento: Se añaden 2,5 µg de membrana a cada pocillo y la mezcla se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación. La reacción se detiene mediante la adición de 25 µl de HCl 0,5 M. El AMPc formado se mide mediante un ensayo de proximidad de centelleo (RPA 542, Amersham, Reino Unido). Se grafica una curva de dosis-respuesta para el compuesto y el valor de EC<sub>50</sub> se calcula mediante el uso del software GraphPad Prism.
- 15 El término "profármaco de un compuesto insulínico" como se usa en la presente descripción significa un compuesto modificado químicamente que después de la administración al paciente se convierte en un compuesto insulínico. Tales profármacos son típicamente versiones extendidas de aminoácidos o ésteres de un compuesto insulínico.
- 20 El término "compuesto de exendina-4", como se usa en la presente descripción, se define como exendina-4 (1-39) (SEQ ID NO. 2), sus fragmentos insulínicos, sus análogos insulínicos y sus derivados insulínicos. Los fragmentos insulínicos de exendina-4 son péptidos insulínicos para los cuales se puede encontrar la secuencia completa en la secuencia de la exendina-4 (SEQ ID NO. 2) y donde se ha eliminado al menos un aminoácido terminal. Los ejemplos de fragmentos insulínicos de exendina-4(1-39) son exendina-4(1-38) y exendina-4(1-31).
- 25 La propiedad insulínica de un compuesto puede determinarse mediante ensayos in vivo o in vitro bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un animal y monitorear la concentración de insulina en el tiempo. Los análogos insulínicos de exendina-4(1-39) se refieren a las moléculas respectivas en donde uno o más de los residuos de aminoácidos se han intercambiado con otros residuos de aminoácidos y/o de los cuales uno o más residuos de aminoácidos se han eliminado y/o de los cuales uno o más residuos de aminoácidos se han agregado con la condición de que dicho análogo sea insulínico o sea un profármaco de un compuesto insulínico. Un ejemplo de un análogo insulínico de exendina-4(1-39) es Ser2Asp3-exendina-4(1-39) en donde los residuos de aminoácidos en la posición 2 y 3 se han sustituido con serina y ácido aspártico, respectivamente (este análogo particular también se conoce en la técnica como exendina-3). Los derivados insulínicos de exendina-4(1-39) y los análogos de esta son los que los expertos en la técnica consideran derivados de estos péptidos, es decir, que tienen al menos un sustituyente que no está presente en la molécula peptídica original con la condición de que dicho derivado sea insulínico o sea un profármaco de un compuesto insulínico. Los ejemplos de sustituyentes son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, ésteres y sustituyentes lipofílicos. Un ejemplo de derivados insulínicos de exendina-4(1-39) y análogos de esta es Tyr31-exendina-4(1-31)-amida.
- 30 El término "compuesto de exendina-4 estable" como se usa en la presente descripción significa una exendina-4(1-39) modificada químicamente, es decir, un análogo o un derivado que exhibe una vida media de eliminación en plasma in vivo de al menos 10 horas en el hombre, como se determina por el método descrito en la definición de "compuesto GLP-1 estable".
- 35 El término "compuesto de exendina-4 protegido de dipeptidil aminopeptidasa IV" como se usa en la presente descripción significa un compuesto de exendina-4 que es más resistente a la peptidasa dipeptidil aminopeptidasa IV (DPP-IV) del plasma que la exendina-4 (SEQ ID NO. 2), como se determina por el ensayo descrito en la definición compuesto GLP-1 protegido de dipeptidil aminopeptidasa IV.
- 40 El término "punto isoeléctrico" como se usa en la presente descripción significa el valor de pH donde la carga neta total de una macromolécula, tal como un péptido, es cero. En los péptidos puede haber varios grupos cargados, y en el punto isoeléctrico la suma de todas esas cargas es cero. A un pH por encima del punto isoeléctrico, la carga neta global del péptido será negativa, mientras que a valores de pH por debajo del punto isoeléctrico, la carga neta total del péptido será positiva.
- 45 El término "reconstituido" como se usa en la presente descripción que se refiere 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 la reconstitución se aplican cuando no se puede producir una composición líquida con una vida útil aceptable. Un ejemplo de una composición farmacéutica reconstituida es la solución que resulta cuando se añade agua a una composición liofilizada. La solución es a menudo para la administración parenteral y, por lo tanto, el agua para inyección se usa típicamente para reconstituir el material sólido.
- 50 El término "aproximadamente", como se usa en la presente descripción, significa una vecindad razonable del valor numérico establecido, como más o menos 10 %.
- 55
- 60
- 65

- 5 En la presente descripción se describe una composición farmacéutica estable en almacenamiento que comprende un péptido insulínico, un conservante farmacéuticamente aceptable, un poloxámero o polisorbato 20 tensioactivo en una concentración de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 400 mg/l, y opcionalmente un modificador de tonicidad farmacéuticamente aceptable donde dicha composición tiene un pH que está en el intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5.
- 10 En una modalidad, la concentración de tensioactivo es de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 300 mg/l. En otra modalidad, la concentración de tensioactivo es de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 200 mg/l.
- 15 En otra modalidad, la concentración de tensioactivo es de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 200 mg/l.
- En otra modalidad, la concentración de tensioactivo es de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 400 mg/l.
- En otra modalidad, la concentración de tensioactivo es de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 300 mg/l.
- En otra modalidad, el tensioactivo es poloxámero 188.
- 20 En otra modalidad, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en poloxámero 407, poloxámero 124, poloxámero 181, poloxámero 182, poloxámero 237, poloxámero 331 y poloxámero 338.
- En otra modalidad, el tensioactivo es polisorbato 20.
- 25 En una modalidad descrita en la presente descripción, es una composición que comprende un péptido insulínico y un alquilpoliglucósido, y opcionalmente un modificador de tonicidad farmacéuticamente aceptable.
- En una modalidad descrita en la presente descripción, es una composición de acuerdo con la modalidad anterior, en donde dicha composición tiene un pH que está en el intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5
- 30 En una modalidad descrita en la presente descripción es una composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el alquilpoliglucósido está presente en una concentración de aproximadamente 10 mg/l.
- 35 En una modalidad descrita en la presente descripción es una composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el alquilpoliglucósido está presente en una concentración de aproximadamente 1000 mg/l. En una modalidad descrita en la presente descripción es una composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el alquilpoliglucósido está presente en una concentración de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 15 000 mg/l.
- 40 En una modalidad descrita en la presente descripción es una composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el alquilpoliglucósido está presente en una concentración de aproximadamente 1000 mg/l a aproximadamente 10 000 mg/l.
- 45 En una modalidad descrita en la presente descripción es una composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el alquilpoliglucósido está presente en una concentración de aproximadamente 2000 mg/l a aproximadamente 5000 mg/l.
- 50 En una modalidad descrita en la presente descripción es una composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el alquilpoliglucósido se selecciona de dodecil  $\beta$ -D-glucopiranosido, dodecil  $\beta$ -D-maltósido, tetradecil  $\beta$ -D-glucopiranosido, decil  $\beta$ -D -maltósido, dodecil  $\beta$ -D-maltósido, tetradecil  $\beta$ -D-maltósido, hexadecil  $\beta$ -D-maltósido, decil  $\beta$ -D-maltotriosido, dodecil  $\beta$ -D-maltotriosido, tetradecil  $\beta$ -D-maltotriosido, hexadecil- $\beta$ -D- maltotriosido, n-dodecil-sacarosa, n-decil-sacarosa.
- 55 En otra modalidad la composición farmacéutica comprende dos tensioactivos diferentes. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende dos tensioactivos diferentes en donde al menos un tensioactivo es un tensioactivo no iónico.
- 60 En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende dos tensioactivos diferentes en donde los dos tensioactivos diferentes son ambos tensioactivos no iónicos.
- 65 En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende dos tensioactivos diferentes en donde todos los tensioactivos son tensioactivos no iónicos.
- En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende poloxámero 188 y polisorbato 20.

- En otra modalidad, la composición farmacéutica tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 8,0.
- 5 En otra modalidad, la composición farmacéutica tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 8,5.
- En otra modalidad, la composición farmacéutica tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 7,7 a aproximadamente 8,2.
- 10 En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un tampón que es un tampón de fosfato.
- En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un tampón que es un tampón zwitteriónico.
- 15 En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un tampón que se selecciona del grupo que consiste en glicilglicina, TRIS, bicina, HEPES, MOBS, MOPS, TES y sus mezclas.
- En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un modificador de tonicidad seleccionado del grupo que consiste en glicerol, propilenglicol y manitol.
- 20 En otra modalidad, el conservante de la composición farmacéutica se selecciona del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol, tiomerosal y sus mezclas.
- 25 En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un péptido insulínico que es un péptido protegido de DPP-IV.
- En otra modalidad, la composición farmacéutica del péptido insulínico comprende un sustituyente lipofílico seleccionado del grupo que consiste en  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$  en donde n es 4 a 38, y  $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$  en donde m es de 4 a 38.
- 30 En otra modalidad, el péptido insulínico de la composición farmacéutica es GLP-1 acilado o un análogo de GLP-1 acilado.
- 35 En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un péptido insulínico que es un análogo de GLP-1 acilado en donde dicho análogo de GLP-1 se selecciona del grupo que consiste en  $\text{Arg}^{34}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Gly}^8\text{-GLP-1(7-36)-amida}$ ,  $\text{Gly}^8\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{-GLP-1(7-36)-amida}$ ,  $\text{Val}^8\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Aib}^8\text{-GLP-1(7-36)-amida}$ ,  $\text{Aib}^8\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Asp}^{22}\text{-GLP-1(7-36)-amida}$ ,  $\text{Val}^8\text{Asp}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-36)-amida}$ ,  $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Lys}^{22}\text{-GLP-1(7-36)-amida}$ ,  $\text{Val}^8\text{Lys}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Arg}^{22}\text{-GLP-1(7-36)-amida}$ ,  $\text{Val}^8\text{Arg}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{His}^{22}\text{-GLP-1(7-36)-amida}$ ,  $\text{Val}^8\text{His}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Trp}^{19}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{Val}^{25}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Tyr}^{16}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Leu}^{16}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Tyr}^{18}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{His}^{37}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{Val}^{25}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{Val}^{25}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{Val}^{25}\text{-GLP-1(7-37)}$ , y análogos de los mismos.
- 40  $\text{Val}^8\text{Tyr}^{16}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Leu}^{16}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Tyr}^{18}\text{Glu}^{22}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{His}^{37}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{Val}^{25}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Glu}^{22}\text{Val}^{25}\text{Ile}^{33}\text{-GLP-1(7-37)}$ ,  $\text{Val}^8\text{Trp}^{16}\text{Glu}^{22}\text{Val}^{25}\text{-GLP-1(7-37)}$ , y análogos de los mismos.
- 45 En otra modalidad, el péptido insulínico de la composición farmacéutica es  $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-}(\gamma\text{-Glu}(\text{N}^\alpha\text{-hexadecanoil})))\text{-GLP-1(7-37)}$ .
- En otra modalidad, la concentración de dicho péptido insulínico está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, en el intervalo de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, en el intervalo de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, en el intervalo de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o en el intervalo de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 8 mg/ml.
- 50 En otra modalidad de la invención, el péptido insulínico es exendina-4 o ZP-10, es decir, HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKNKKK-NH<sub>2</sub>.
- 55 En otra modalidad, el péptido insulínico de la composición farmacéutica es exendina-4 acilada o un análogo de exendina-4 acilada.
- En otra modalidad, el péptido insulínico de la composición farmacéutica es [N-épsilon(ácido 17-carboxiheptadecanoico)]<sub>20</sub> exendina-4(1-39)-amida.
- 60

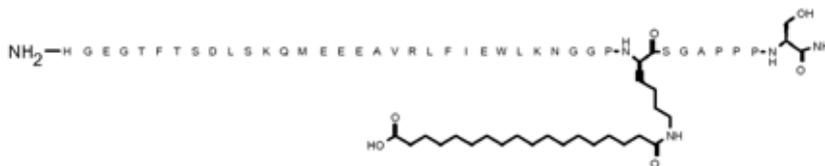


65

o

N-épsilon32-(17-carboxi-heptadecanoil)[Lys32]exendina-4(1-39)amida

5



10

15 En otra modalidad de la composición farmacéutica, la concentración del péptido insulínico en la composición farmacéutica es de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 5 mg/ml de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, o de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml.

20 Otro aspecto descrito en la presente descripción es un método para la preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, dicho método que comprende disolver dicho péptido insulínico y mezclar el conservante y el modificador de tonicidad.

25 En la presente descripción también se describe un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, método que comprende calentar una solución de dicho compuesto GLP-1 a pH alcalino a una temperatura superior a 40 °C durante al menos 5 minutos. Las concentraciones del compuesto GLP-1 durante el tratamiento térmico generalmente se prefieren en el intervalo de 10 g/L a 100 g/L. El compuesto GLP-1 se puede disolver en una solución acuosa que tiene la temperatura final, o se puede disolver en una solución acuosa que tiene temperatura ambiente, seguido por calentamiento a la temperatura apropiada durante el tiempo especificado.

30 Se ha demostrado que la estabilidad física del compuesto GLP-1, liraglutida, mejoró significativamente a medida que aumentaba la temperatura del tratamiento térmico (22 a 80 °C). Para las temperaturas de 60 y 80 °C, se demostró que el tiempo del tratamiento térmico tenía una fuerte influencia sobre la estabilidad física de la liraglutida, ya que 120 minutos de tratamiento térmico mostraron mejorar significativamente la estabilidad física en comparación con 1 minuto de tratamiento térmico. También se ha demostrado que la estabilidad física de la liraglutida mejoró significativamente al aumentar la temperatura de 22 a 50-80 °C a pH 9-10 (ejemplos cn.f). Para todas las temperaturas, se demostró que el tiempo de tratamiento térmico influye en la estabilidad física de la liraglutida, ya que 15 a 20 minutos de tratamiento térmico mostró mejorar significativamente la estabilidad física en comparación con 1 minuto de tratamiento térmico.

35 Las condiciones óptimas para el tratamiento térmico para disolver los gérmenes de fibrillas parecen ser 3-20 minutos a pH 9-10,5 y 70-85 °C. En la escala de producción, esto podría realizarse mediante el uso de métodos comunes para el calentamiento rápido y el enfriamiento de grandes volúmenes mediante intercambiadores de calor.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, método que comprende calentar una solución de dicho compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8,0 y pH 10,5 a una temperatura entre 50 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 180 minutos.

45 En una modalidad, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, método que comprende calentar una solución de dicho compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8,0 y pH 10,0 a una temperatura entre 50 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 180 minutos.

50 En otra modalidad, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, método que comprende calentar una solución de dicho compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8,0 y pH 10,0 a una temperatura entre 50 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 120 minutos.

55 En otra modalidad, la temperatura está entre 60 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 5 minutos y 15 minutos.

60 En otra modalidad, la temperatura está entre 60 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 1 minuto y 15 minutos.

65 En otra modalidad, la temperatura está entre 60 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 30 minutos.

En otra modalidad, la temperatura está entre 60 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 5 minutos y 30 minutos.

5 En otra modalidad, la presente invención se refiere a un método para la preparación de una solución estable de exendina-4, método que comprende calentar una solución de exendina-4 que tiene un pH entre pH 8,0 y pH 10,0 a una temperatura entre 50 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 120 minutos.

10 Otra modalidad descrita en la presente descripción es un método para la preparación de una solución estable de Aib<sup>8,35</sup>-GLP-1(7-36)-amida, método que comprende calentar una solución de Aib<sup>8,35</sup>-GLP-1(7-36)-amida que tiene un pH entre pH 8,0 y pH 10,0 a una temperatura entre 50 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 120 minutos.

En otra modalidad, el compuesto GLP-1 es Arg<sup>34</sup>Lys<sup>26</sup>(N<sup>ε</sup>-(γ-Glu (N<sup>α</sup>-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37).

15 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 calentar una solución de dicho compuesto GLP-1. En la presente descripción se describe un método como el anterior en donde la temperatura está entre 50 °C y 95 °C.

20 En la presente descripción se describe un método como el anterior en donde la temperatura está entre 60 °C y 95 °C.

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

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

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

En un aspecto, la invención se refiere a un método como el anterior en donde el pH está entre aproximadamente 8,0 y 10,5.

30 En un aspecto, la invención se refiere a un método como el anterior en donde el pH está entre aproximadamente 8,0 y 10,0.

En un aspecto, la invención se refiere a un método como el anterior en donde el pH está entre aproximadamente 8,0 a aproximadamente 9,7.

35 Un aspecto descrito en la presente descripción es un método como el anterior en donde el pH está entre aproximadamente 7,5 a 8,5.

40 Un aspecto descrito en la presente descripción es un método como el anterior en donde el pH es de aproximadamente 7,7

En un aspecto, la invención se refiere a un método como el anterior en donde el pH es aproximadamente 8,15;

45 En un aspecto, la invención se refiere a un método como el anterior en donde el calentamiento continúa durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 180 minutos.

En un aspecto, la invención se refiere a un método como el anterior en donde el calentamiento continúa durante un período de tiempo que está entre 10 minutos y 90 minutos.

50 En un aspecto, la invención se refiere a un método como el anterior en donde el calentamiento continúa durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 30 minutos.

En un aspecto, la invención se refiere a un método como el anterior en donde el calentamiento continúa durante un período de tiempo que está entre 5 minutos y 15 minutos.

55 En un aspecto, la invención se refiere a un método como el anterior, en donde el pH está entre pH 8,0 y pH 10,5 y el método incluye calentar a una temperatura entre 50 °C y 85 °C durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 180 minutos.

60 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 calentar una solución de dicho compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8,0 y pH 10,0 a una temperatura entre 50 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 180 minutos.

65 En una modalidad, 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 calentar una solución de dicho

compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8,0 y pH 10,0 a una temperatura entre 50 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 120 minutos.

5 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 calentar una solución de dicho compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8,0 y pH 10,0 a una temperatura entre 70 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 30 minutos.

10 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 calentar una solución de dicho compuesto GLP-1 que tiene un pH entre pH 8,0 y pH 10,0 a una temperatura entre 60 °C y 80 °C durante un período de tiempo que está entre 5 minutos y 15 minutos.

15 En la presente descripción se describe un método para la preparación de una solución estable de un compuesto GLP-1, método que comprende calentar una solución de dicho compuesto GLP-1 a una temperatura entre 60 °C y 95 °C durante un período de tiempo que está entre 10 minutos y 90 minutos. El aspecto anterior incluye valores de pH de las soluciones de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5. En un aspecto el pH es de aproximadamente 7,7. En un aspecto de la invención, el valor de pH es aproximadamente 8,15.

20 En un aspecto, la invención se refiere a un método para la 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.

25 En un aspecto, la invención se refiere a un método para la preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un compuesto GLP-1, método que comprende un producto peptídico a volumen que se ha producido mediante el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores seguido por liofilización de la solución o suspensión de dicho péptido similar al glucagón.

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

35 En un aspecto, la invención se refiere a un método para la 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 primer aspecto y seguido por un tratamiento de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, ya sea antes de llenar un sistema de suministro final o después de llenar un sistema de suministro final o ambos.

40 En un aspecto, la invención se refiere a un método de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, en donde dicho compuesto GLP-1 es Arg<sup>34</sup>,Lys<sup>26</sup>(N<sup>ε</sup>-(γ-Glu (N<sup>α</sup>-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37).

45 En la presente descripción se describe un método para el tratamiento de la hiperglicemia que comprende la administración parenteral de una cantidad efectiva de la composición farmacéutica a un mamífero que necesita tal tratamiento.

50 En la presente descripción se describe un método para el tratamiento de la obesidad, la deficiencia de células beta, IGT o dislipidemia que comprende la administración parenteral de una cantidad efectiva de la composición farmacéutica a un mamífero que necesita tal tratamiento.

## EJEMPLOS

50 Procedimiento general

Ensayo de fibrilación con tioflavina T (ThT): Principio y ejemplos

55 Una baja estabilidad física de un péptido puede conducir a la formación de fibrillas amiloides, que se observan como estructuras macromoleculares en forma de filamentos, bien ordenadas, en la muestra, que eventualmente resulta en la formación de un gel. Tradicionalmente esto se ha medido mediante inspección visual de la muestra. Sin embargo, ese tipo de medición es muy subjetiva 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 de este tipo y tiene una firma de fluorescencia distinta cuando se une a las fibrillas [Naiki y otros (1989) Anal. Biochem. 177, 244-249 LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309, 274-284]. El curso temporal para la formación de fibrillas puede describirse mediante una curva sigmoidea con la siguiente expresión [Nielsen y otros (2001) Biochemistry 40, 6036-6046.], cn.f figura 6:

65

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

5 Aquí, F es la fluorescencia de ThT en 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 fibrillas son el tiempo de retraso calculado mediante  $t_0 - 2\tau$  y la constante de la velocidad aparente  $k_{app} = 1/\tau$ .

10 La formación de un intermediario parcialmente plegado del péptido se sugiere como un mecanismo de iniciación general para la fibrilación. Pocos de los intermediarios forman un núcleo para formar un molde sobre el cual otros intermediarios pueden ensamblarse y continuar con la formación de fibrillas. El tiempo de retraso corresponde al intervalo en que la masa crítica del núcleo se construye y la constante de la tasa aparente es la tasa con que se forma la propia fibrilla.

15 Preparación de la muestra

Las muestras se prepararon al momento antes de cada ensayo. Cada composición de la muestra se describe en las leyendas. El pH de la muestra se ajustó al valor deseado mediante el uso de cantidades adecuadas de NaOH y HClO<sub>4</sub> concentrados. La tioflavina T se añadió a las muestras a partir de una solución madre en H<sub>2</sub>O a una concentración final de 1 µM.

20 Las alícuotas de muestra de 200 µl se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Packard OptiPlate™-96, poliestireno blanco). Usualmente, ocho réplicas de cada muestra (correspondiente a una condición de prueba) se situaron en una columna de pocillos. La placa se selló con Scotch Pad (Qiagen).

25 Medición de la incubación y la fluorescencia.

La incubación a una temperatura determinada, la agitación y la medición de la emisión de fluorescencia de ThT se realizaron en un lector de placas 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 realizó mediante el uso de excitación a través de un filtro de 444 nm y la medición de emisión a través de un filtro de 485 nm. Cada corrida se inició mediante incubación de la placa a la temperatura del ensayo durante 10 min. La placa se midió cada 20 minutos durante típicamente 45 horas. Entre cada medición, la placa se agitó y calentó como se describe.

35 Manejo de los datos.

Los puntos de medición se guardaron en formato de Microsoft Excel para un procesamiento adicional y el dibujo y ajuste de la curva se realizó mediante el uso de GraphPad Prism. La emisión de fondo de ThT en ausencia de fibrillas fue insignificante. Los puntos de los datos son típicamente una media de ocho muestras y se muestran con barras de error de la desviación estándar. Solo los datos obtenidos en el mismo experimento (es decir las muestras en la misma placa) se presentan en el mismo gráfico asegurando una medida de formación de fibrillas relativa entre las muestras individuales de un ensayo en lugar de la comparación entre diferentes ensayos.

45 Los conjuntos de datos pueden ajustarse a la Ec. (1). Sin embargo, dado que las curvas sigmoidales completas en este caso no se logran usualmente durante el tiempo de medición, el grado de fibrilación se expresa como la fluorescencia de ThT en varios puntos de tiempo calculados como la media de las ocho muestras y se muestra con la desviación estándar.

50 Ejemplo 1

El ensayo de fibrilación ThT de una composición farmacéutica del análogo de GLP-1 acilado liraglutida se muestra en la Figura 1 (el experimento se realizó siguiendo los procedimientos descritos en la sección titulada "Procedimiento general"). Después de aproximadamente 10 horas, la emisión de fluorescencia de ThT aumenta, lo que indica el inicio de la fibrilación. Esta señal aumenta constantemente y alcanza una meseta antes de que finalice el ensayo. Sin embargo, en presencia de 200 ppm de Poloxámero 188, la señal de fluorescencia de ThT permanece en el nivel basal. Esto indica que no se produce fibrilación y, por lo tanto, la composición farmacéutica es estable físicamente bajo estas condiciones. Las composiciones farmacéuticas usadas en el ejemplo 1 (Figura 1) no se agrega un tampón.

60 Ejemplo 2

El efecto de Poloxámero 188 en una composición farmacéutica de liraglutida que contiene fosfato de sodio como un tampón se muestra en la Figura 2 (el experimento se realizó siguiendo los procedimientos descritos en la sección titulada "Procedimiento general"). Aquí, la presencia de 50 ppm de Poloxámero 188 prolonga el tiempo de latencia antes del inicio de la fibrilación, mientras que 100 ppm de Poloxámero 188 inhibe completamente la fibrilación durante el tiempo de ensayo.

Ejemplo 3

5 El Polisorbato 20 también estabiliza las formulaciones de liraglutida. Un ejemplo se muestra en la Figura 3 (el experimento se realizó siguiendo los procedimientos descritos en la sección titulada "Procedimiento general"). La presencia de 200 ppm de Polisorbato 20 atenúa la fibrilación, que se observa como una velocidad de crecimiento más lenta de la señal de fluorescencia de ThT. Por lo tanto, se observa una señal de fluorescencia de ThT significativamente menor en la muestra de Polisorbato 20 que en la referencia después de 40 horas de incubación.

Ejemplo 4

10 Se preparan dos composiciones farmacéuticas:

F1. Liraglutida 1,2 mM, propilenglicol 14 mg/ml, fenol 40 mM, 3 Zn/hexámero, aspart 0,6 mM, bicina 8 mM, poloxámero 188 50 ppm, pH 7,7.

15 F2. Liraglutida 1,2 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, 3 Zn/hexámero, aspart 0,6 mM, bicina 8 mM, pH 7,7.

20 La estabilidad física de las composiciones farmacéuticas se evalúa mediante una prueba de estrés acelerado. La prueba de estrés se realiza como una prueba de rotación. Se añade 50 µl de aire a 5 cartuchos (viales de vidrio) de cada formulación. Los cartuchos se rotan con una frecuencia de 30 rotaciones por minuto durante 4 horas diarias. La prueba se detiene después de 22 días de rotación. La inspección de los cartuchos se realiza diariamente o según se requiera. La turbidez de las composiciones farmacéuticas se caracteriza por la medición nefelométrica de la turbidez en un turbidímetro HACH 2100AN. La medición de turbidez de un líquido se especifica en "Unidad de Turbidez Nefelométrica" (NTU). La inestabilidad física de la proteína se caracteriza por mediciones de alta turbidez.

25 El experimento muestra que la composición F2 tiene un aumento mucho más rápido en NTU en comparación con aquel de la composición F1.

Ejemplo 5

30 Se prepararon tres composiciones farmacéuticas:

F1. Liraglutida 1,6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, pH 7,7.

35 F2. Liraglutida 1,6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, 100 µg/ml de Poloxámero 188, pH 7,7.

F3. Liraglutida 1,6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, 200 µg/ml de Poloxámero 188, pH 7,7.

40 Las composiciones farmacéuticas F1-F3 se sometieron a la prueba de rotación como se describió en el ejemplo 4. Las mediciones resultantes de NTU en función del tiempo se muestran en la figura 4.

Ejemplo 6

45 Se prepararon dos composiciones farmacéuticas:

F1. Liraglutida 1,6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, poloxámero 407 0 µg/ml (Pluronic F-127), pH 7,7.

50 F2. Liraglutida 1,6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, poloxámero 407 200 µg/ml (Pluronic F-127), pH 7,7.

55 Las formulaciones se probaron con respecto a la estabilidad física mediante el uso del ensayo de Tioflavina T. Las formulaciones se colocan en placas de 96 pocillos (Black NUNC) y se incuban a 37 °C hasta por 72 h en el fluorímetro de placa de microtitulación BMG FLUOstar mediante el uso del siguiente programa: [300 rpm 15 min, 5 min de reposo]<sub>n</sub> = 72. Las medidas resultantes se muestran en la figura 5 (la curva inferior es F2)

Ejemplo 7

60 La solución 1 se preparó al disolver el conservante, el agente isotónico y el tampón en agua, el pH se ajustó a 7,3. En otro recipiente, se preparó la solución 2: la liraglutida se disolvió en agua caliente a 60 °C y se mantuvo en un baño de agua a 60 °C durante 1, 20 y 120 minutos. El tratamiento térmico de la liraglutida se llevó a cabo en una solución que tiene pH de aproximadamente 8 y 10. Después del tratamiento térmico, la solución 2 se enfrió a 22 °C, donde después se mezclaron las dos soluciones y se ajustó el pH a 7,7 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0,22 µm.

65

La estabilidad física de las preparaciones de liraglutida se evaluó mediante el uso de un método de fluorescencia; la prueba de Tioflavina T donde se usó el tinte histológico tiazol Tioflavina T (ThT) como un indicador de la formación de fibrillas. Mediante el uso de la prueba de Tioflavina T fue posible determinar la presencia de fibrillas en las diferentes formulaciones. El método se basó en las características fluorescentes de ThT. En presencia de fibrillas, la fluorescencia de ThT exhibió un máximo de excitación a 450 nm y una emisión aumentada a 482 nm. Se ha demostrado que la intensidad de fluorescencia de ThT es lineal con un aumento en la concentración de fibrillas. Se usó ThT en una prueba de estrés que aplica las diferentes formulaciones en placas de microtitulación con ThT a 35 °C y se agitó a 350 rpm hasta que las formulaciones se fibrilaron. Se obtuvieron gráficos de la intensidad de fluorescencia (FI) en función del tiempo (seg). La variable de respuesta fue; tiempo (segundos) para lograr una intensidad de fluorescencia de 400, por ejemplo, cuanto más tiempo se tarda en alcanzar FI = 400, más estable es la formulación.

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

Los resultados de los experimentos se muestran en las figuras 7 y 8.

los siguientes experimentos son sin tensioactivo - tratamiento térmico 3

#### Ejemplo 7a

La solución 1 se prepara al disolver el conservante, el agente isotónico y el tampón en agua, y el pH se ajustó a 7,9. En otro recipiente, se prepara la solución 2: la liraglutida se disuelve en agua caliente a 60 °C y se mantiene en un baño de agua a 60 °C durante 1, 20 y 120 minutos. El tratamiento térmico de liraglutida se lleva a cabo en una solución que tiene un pH de aproximadamente 8 y 10. Las dos soluciones se mezclan y el pH se ajusta a 8,15 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtra a través de un filtro de 0,22 µm.

La estabilidad física de las preparaciones de liraglutida se evalúa mediante el uso de un método de fluorescencia; la prueba de Tioflavina T donde se usa el tinte histológico tiazol Tioflavina T (ThT) como un indicador de la formación de fibrillas. Mediante el uso de la prueba de Tioflavina T fue posible determinar la presencia de fibrillas en las diferentes formulaciones. El método se basa en las características fluorescentes de ThT. En presencia de fibrillas, la fluorescencia de ThT exhibió un máximo de excitación a 450 nm y una emisión aumentada a 482 nm. La intensidad de fluorescencia ThT se muestra lineal con un aumento en la concentración de fibrillas.

#### Ejemplo 8

La solución 1 se preparó al disolver el conservante, el agente isotónico y el tampón en agua, el pH se ajustó a 7,3. En otro recipiente, se preparó la solución 2: 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 aproximadamente 8 y 10. Después del tratamiento térmico, la solución 2 se enfrió a 22 °C, donde después se mezclaron las dos soluciones y se ajustó el pH a 7,7 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0,22 µm.

La estabilidad física y la pureza de las preparaciones se midieron como se describió en el ejemplo 7. Los resultados de los experimentos se muestran en las figuras 9 y 10.

#### Ejemplo 8a

La solución 1 se prepara al disolver el conservante, el agente isotónico y el tampón en agua, y el pH se ajustó a 7,9. En otro recipiente, se prepara la solución 2: la liraglutida se disuelve en agua caliente a 80 °C y se mantiene en un baño de agua a 80 °C durante 1, 20 y 120 minutos. El tratamiento térmico de liraglutida se lleva a cabo en una solución que tiene un pH de aproximadamente 8 y 10. Las dos soluciones se mezclan y el pH se ajusta a 8,15 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtra a través de un filtro de 0,22 µm.

La estabilidad física de las preparaciones de liraglutida se evalúa mediante el uso de un método de fluorescencia; la prueba de Tioflavina T donde se usa el tinte histológico tiazol Tioflavina T (ThT) como un indicador de la formación de fibrillas. Mediante el uso de la prueba de Tioflavina T fue posible determinar la presencia de fibrillas en las diferentes formulaciones. El método se basa en las características fluorescentes de ThT. En presencia de fibrillas, la fluorescencia de ThT exhibió un máximo de excitación a 450 nm y una emisión aumentada a 482 nm. La intensidad de fluorescencia ThT se muestra lineal con un aumento en la concentración de fibrillas.

#### Ejemplo 9

La solución 1 se preparó al disolver el conservante, el agente isotónico y el tampón en agua, el pH se ajustó a 7,3. En otro recipiente se preparó la solución 2: se disolvió liraglutida en agua a varias temperaturas: 22, 40, 60 y 80 °C y se mantuvo en un baño de agua durante 15 minutos para todas las temperaturas investigadas. Los tratamientos térmicos de liraglutida se llevaron a cabo en una solución con un pH de aproximadamente 10. Después del tratamiento térmico,

la solución 2 se enfrió a 22 °C, donde después se mezclaron las dos soluciones y se ajustó el pH a 7,7 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0,22 µm.

La estabilidad física de las preparaciones se midió como se describió en el ejemplo 7.

5

Los resultados de los experimentos se muestran en la figura 11.

#### Ejemplo 10

10 Antes de la liofilización, la sustancia farmacológica liraglutida se disuelve en agua caliente a 70-80 °C a un pH de aproximadamente 8,0-10,0 a una concentración de 10-100 g/l. El tratamiento térmico se realiza durante 3-30 minutos. De aquí en adelante la DS se liofiliza. Posteriormente, la sustancia farmacológica liofilizada se disuelve en agua. La concentración es de aproximadamente 10-100 g/L y el pH de la solución (solución 2) es de aproximadamente 8-10.

15 Otra solución (solución 1) se prepara al disolver el conservante, el agente isotónico y el tampón en agua. El pH se ajusta a 7,9. Las dos soluciones se mezclan y el pH se ajusta a 8,15 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico.

#### Ejemplo 10a

20 El tratamiento de base del ejemplo 10a se puede realizar con o sin el tratamiento térmico descrito en el ejemplo 10 antes de la liofilización. En una modalidad especial, el tratamiento de la sustancia farmacológica en el ejemplo 10a puede realizarse a 75 °C durante 8 minutos antes de la liofilización.

#### Ejemplo 10b

25 Antes de la liofilización, la sustancia farmacológica liraglutida se disuelve en agua caliente a 70-80 °C a un pH de aproximadamente 8,0-10,0 a una concentración de 10-100 g/l. El tratamiento térmico se realiza durante 3-30 minutos. De aquí en adelante la DS se liofiliza. Posteriormente, la sustancia farmacológica liofilizada se disuelve en agua. La concentración es de aproximadamente 10-100 g/L y el pH de la solución (solución 2) es de aproximadamente 8-10.

30 Otra solución (solución 1) se prepara al disolver el conservante, el agente isotónico y el tampón en agua. El pH se ajusta a 7,3. Las dos soluciones se mezclan y el pH se ajusta a 7,7 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico.

#### Ejemplo 10c

35 El tratamiento de base del ejemplo 10c puede realizarse con o sin el tratamiento térmico descrito en el ejemplo 10b antes de la liofilización. En una modalidad especial, el tratamiento de la sustancia farmacológica en el ejemplo 10c puede realizarse a 75 °C durante 8 minutos antes de la liofilización.

#### Ejemplo 11

40 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 durante 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 liofilizó. El polvo se disolvió en una

45 solución que contenía conservante, agente isotónico y componentes de tampón y el pH se ajustó a pH 7,7 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico.

50 La estabilidad física de las 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 mediante el uso de HPLC de fase inversa.

Los resultados se muestran en las figuras 12 y 13.

#### Ejemplo 12

55 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 durante 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 0,22 µm y se liofilizó. El polvo se disolvió en una solución que contenía conservante, agente isotónico y componentes de tampón y el pH se ajustó a pH 7,7.

60 La estabilidad física de las 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 mediante el uso de HPLC de fase inversa.

65 Los resultados se muestran en la figura 14.

## Ejemplo 13

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

5 Tabla 1. Los excipientes se mantuvieron constantes.

Parámetro	Concentración
Liraglutida	6,25 mg/ml
Propilenglicol	14,0 mg/ml
Fenol	5,50 mg/ml
Tioflavina T	1 mM
pH = 7,7	

20 Tabla 2. Excipientes específicos.

Excipientes	Concentración
Solutol HS-15	100 o 200 µg/ml
Pluronic F-127 (Poloxámero 407)	100 o 200 µg/ml
Hidrógeno fosfato de disodio, dihidrato.	8 mM
Tricina	10 mM

8 x 250 µl de cada formulación (8 repeticiones) se pipetearon en una placa de 96 pocillos (Black NUNC). Posteriormente, las placas se sellaron mediante el uso "Cinta de sellado para placas, NUNC".

La placa se insertó en un fluorímetro de placa de microtitulación BMG FLUOstar. La excitación se midió a  $440 \pm 10$  nm y la emisión a  $480 \pm 10$  nm. Los datos se muestrearon durante 72 h (aprox. 260 000 seg). El fluorímetro de placa de microtitulación BMG FLUOstar se programó como se indica aquí: [600 rpm durante 300 segundos, reposo 100 segundos]<sub>n = 72</sub> mediante el uso de doble rotación orbital.

De lo que se puede ver en la figura 1 y 2, las formulaciones que contienen Solutol HS-15 en tampón fosfato son solo ligeramente más estables que la formulación de referencia. Las formulaciones que contienen 100 o 200 µg/ml de Pluronic F-127 en tampón de fosfato son más estables. Interesantemente, las formulaciones que contienen Solutol HS-15 o Pluronic F-127 en tampón de tricina son excepcionalmente estables, especialmente la última.

## Ejemplo 14

La solución 1 se preparó al disolver el conservante, el agente isotónico y el tampón en agua, el pH se ajustó a 7,9. En otro recipiente, se preparó la solución 2: 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 una solución que tiene pH de aproximadamente 8 y 10. Después del tratamiento térmico, la solución 2 se enfrió a 22 °C, donde después se mezclaron las dos soluciones y se ajustó el pH a 8,15 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0,22 µm.

La estabilidad física de las preparaciones de liraglutida se evaluó mediante el uso de un método de fluorescencia; la prueba de Tioflavina T donde se usó el tinte histológico de tiazol tioflavina T (ThT) como un indicador de la formación de fibrillas. Mediante el uso de la prueba de Tioflavina T fue posible determinar la presencia de fibrillas en las diferentes formulaciones. El método se basó en las características fluorescentes de ThT. En presencia de fibrillas, la fluorescencia de ThT exhibió un máximo de excitación a 450 nm y una emisión aumentada a 482 nm. Se ha demostrado que la intensidad de fluorescencia de ThT es lineal con un aumento en la concentración de fibrillas.

Se usó ThT en una prueba de estrés que aplica las diferentes formulaciones en placas de microtitulación con ThT a 35 °C y se agitó a 350 rpm hasta que las formulaciones se fibrilaron. Se obtuvieron gráficos de la intensidad de fluorescencia (FI) en función del tiempo (seg). La variable de respuesta fue; el tiempo (s) para alcanzar una intensidad de fluorescencia de 400, por ejemplo, a mayor tiempo para alcanzar FI = 400, la formulación es más estable.

Los resultados se muestran en la figura 17.

## Ejemplo 15

La solución 1 se preparó al disolver el conservante, el agente isotónico y el tampón en agua, el pH se ajustó a 7,9. En otro recipiente, se preparó la solución 2: 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 una solución que tiene pH de aproximadamente 8 y 10. Después del tratamiento térmico, la solución 2 se enfrió a 22 °C, donde después se mezclaron las dos soluciones y se ajustó el pH a 8,15 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Finalmente, la formulación se filtró a través de un filtro de 0,22 µm.

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

Las formulaciones como se describieron anteriormente pueden incluir todos los tensioactivos como se describió previamente en los ejemplos 8 - 15 y los tensioactivos como se describieron anteriormente. Los tensioactivos se disuelven en la solución 1 y posteriormente se mezclan con la solución 2 dando como resultado una formulación final. En un aspecto de la invención, los tensioactivos pueden estar en concentraciones de 0 - 50 mg/ml.

Ejemplo 16

Tabla 1. Penfill® que contenía liraglutida fibrilada se trató térmicamente durante 30 minutos a 85 °C. El producto farmacológico de liraglutida recién producido tiene una turbidez de aprox. 0,2-1,0 NTU. Por lo tanto, el tratamiento térmico del producto farmacológico de liraglutida altamente fibrilado puede disolver las estructuras de fibrillas, por lo demás muy estables.

Penfill antes del tratamiento térmico (NTU)	Penfill después del tratamiento térmico (NTU)
Aprox. 50 (promedio de 10 penfill que contienen liraglutida fibrilada DP)	0,382
	0,182
	0,275
	0,174
	0,284
	0,356
	0,24
	0,326
	0,19
	0,836

La Figura 18 muestra el tratamiento térmico de Penfill® en diferentes momentos y temperaturas que posteriormente se sometieron a rotación.

Los ejemplos anteriores se pueden realizar individualmente o en combinación.

En un aspecto de la invención, el procedimiento es el siguiente:

Antes de la liofilización, la sustancia farmacológica liraglutida se disuelve en agua caliente a 70-80 °C a un pH de aproximadamente 8,0-10,0 a una concentración de 10-100 g/l. El tratamiento térmico se realiza durante 3-30 minutos. De aquí en adelante la sustancia farmacológica se liofiliza. Posteriormente, la sustancia farmacológica liofilizada se disuelve en agua caliente a 50-80 °C durante 30-180 min. La concentración es de aproximadamente 10-100 g/L y el pH de la solución (solución 2) es de aproximadamente 8-10. Otra solución (solución 1) se prepara al disolver el conservante, el agente isotónico y el tampón en agua. El pH se ajusta a 7,9. Las dos soluciones se mezclan y el pH se ajusta a 8,15 mediante el uso de 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 rellenar los sistemas de cierre de los recipientes, el producto farmacológico de liraglutida resultante puede exponerse a un tratamiento térmico a 60-95 °C durante 10-90 minutos.

Ejemplo 17

Uso de n-dodecil-β-D-maltósido (DDM) y Zwittergent 3-10 en formulaciones que comprenden liraglutida: Se probaron las formulaciones F1, F2 y F3.

La estabilidad física de las formulaciones se evalúa mediante una prueba de estrés acelerado. La prueba de estrés se realiza como una prueba de rotación a 37 °C. Se agregan 50 µl de aire a 5 cartuchos (viales de vidrio de 3 ml) de cada

formulación. Los cartuchos se rotan con una frecuencia de 30 rotaciones por minuto durante 4 horas diarias. La prueba se detuvo después de 37 días de rotación. La inspección de los cartuchos se realiza diariamente o según se requiera. La turbidez de la formulación se caracteriza por la medición nefelométrica de la turbidez en un turbidímetro HACH 2100AN. La medición de turbidez de un líquido se especifica en "Unidad de Turbidez Nefelométrica" (NTU). La inestabilidad física de la proteína se caracteriza por mediciones de alta turbidez.

Se realizaron los siguientes experimentos:

Ref.: Liraglutida 6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, pH 7,7.

F1. Liraglutida 1,6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, Zwittergent 3-10 10 mM, pH 7,7.

F2. Liraglutida 1,6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, DDM 10 mM, pH 7,7.

F3. Liraglutida 1,6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, DDM 25 mM, pH 7,7.

Los resultados se muestran en la Fig. 19.

Ejemplo 18

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

F1. Liraglutida 1,6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, Zwittergent 3-10 10 mM, pH 7,7.

F2. Liraglutida 1,6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, DDM 10 mM, pH 7,7.

F3. Liraglutida 1,6 mM, 14 mg/ml de propilenglicol, fenol 40 mM, fosfato de sodio 8 mM, DDM 25 mM, pH 7,7.

Los resultados se muestran en la Fig. 20.

Listado de secuencias

<110> Novo Nordisk A/S

<120> FORMULACIONES ESTABLES DE PÉPTIDOS

<130> 7001-515-EP

<150> PA 2004 01753

<151> 2004-11-12

<150> PA 2004 01906

<151> 2004-12-08

<150> EP05104050.9

<151> 2005-05-13

<150> EP05104172.1

<151> 2005-05-18

<150> PCT/EP05/055916

<151> 2005-11-11

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 735 533 T3

1 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 5  
 5 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
 20 25 30  
 <210> 2  
 10 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Heloderma suspectum  
 <400> 2  
 15 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15  
 20 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 25 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 <210> 3  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ZP-10  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (44)..(44)  
 <223> AMIDACIÓN  
 40 <400> 3  
 45 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15  
 45 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 50 Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
 35 40  
 <210> 4  
 <211> 39  
 55 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> compuesto sintético  
 60 <220>  
 <221> MISC\_CARACTERÍSTICA  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Lys se sustituye  
 65 <220>

ES 2 735 533 T3

<221> MOD\_RES  
 <222> (39)..(39)  
 <223> AMIDACIÓN

5 <400> 4

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

10

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

15

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

<210> 5  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> compuesto sintético

25

<220>  
 <221> MISC\_CARACTERÍSTICA  
 <222> (32)..(32)  
 <223> Lys se sustituye

30

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (39)..(39)  
 <223> AMIDACIÓN

35

<400> 5

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

40

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Lys  
 20 25 30

45

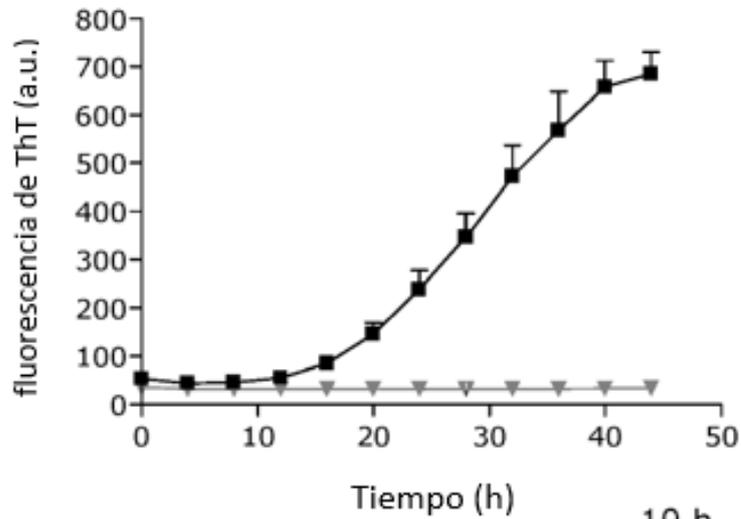
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de una solución estable de un derivado insulínico de GLP-1(7-37), método que comprende calentar una solución de dicho derivado insulínico, en donde la temperatura está entre 50 °C y 85 °C, el pH está entre 8,0 a 10,5 y dicho calentamiento se continúa durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 180 minutos.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha temperatura está entre 60 °C y 85 °C.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha temperatura está entre 70 °C y 85 °C.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho pH está entre 8,0 a 10,0.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho pH está entre 8,0 a 9,7.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho pH está entre 8,5 y 10,5.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho pH está entre 8,5 y 10,0.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho pH es 8,15.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho calentamiento continúa durante un período de tiempo que está entre 15 minutos y 120 minutos.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho calentamiento continúa durante un período de tiempo que está entre 10 minutos y 90 minutos.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho calentamiento continúa durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 30 minutos.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho derivado insulínico es Arg<sup>34</sup>Lys<sup>26</sup>(N<sup>ε</sup>-(γ-Glu (N<sup>α</sup>-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37) y dicho calentamiento se continúa durante un período de tiempo que está entre 15 minutos y 20 minutos.
13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho calentamiento continúa durante un período de tiempo que está entre 5 minutos y 15 minutos.
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho calentamiento se continúa durante un período de tiempo que está entre 5 minutos y 30 minutos.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho pH está entre pH 9 y pH 10,5 y dicho método incluye calentar a una temperatura entre 70 °C y 85 °C durante un período de tiempo que está entre 3 minutos y 20 minutos.
16. Un método para la preparación de un derivado insulínico estable de GLP-1(7-37), método que comprende que se produzca un producto peptídico a volumen mediante el procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-15, seguido por la liofilización de la solución o suspensión de dicho derivado insulínico.
17. Un método para la preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un derivado insulínico de GLP-1(7-37), método que comprende que la composición farmacéutica se prepare a partir de un producto liofilizado producido por el procedimiento como se define en la reivindicación 16 seguido por uno o más de los métodos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, método que se realiza antes de llenar en un sistema de suministro final o después de llenar en un sistema de suministro final o ambos.
19. Un método para la preparación de una composición farmacéutica estable en almacenamiento de un derivado insulínico de GLP-1(7-37), método que comprende los métodos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1-16, seguido por la adición de excipientes farmacéuticamente aceptables.

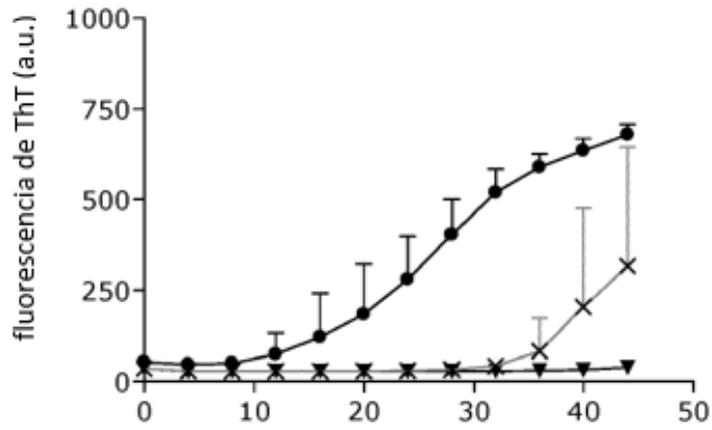
20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-19, en donde la concentración de dicho derivado insulínico en dicha composición farmacéutica es de 5 µg/mL a 10 mg/ml, tal como de 1 mg/ml a 10 mg/ml.
- 5 21. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde la concentración de dicho derivado insulínico, durante el tratamiento térmico está en el intervalo de 10 g/L a 100 g/L.
22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho derivado insulínico es Arg<sup>34</sup>Lys<sup>26</sup>(N<sup>ε</sup>-(γ-Glu (N<sup>α</sup>-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37).
- 10 23. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho derivado insulínico (i) se disuelve en una solución acuosa que tiene la temperatura final o (ii) se disuelve en una solución acuosa que tiene temperatura ambiente, seguido por el calentamiento a la temperatura apropiada durante el tiempo especificado.
- 15

Figura 1



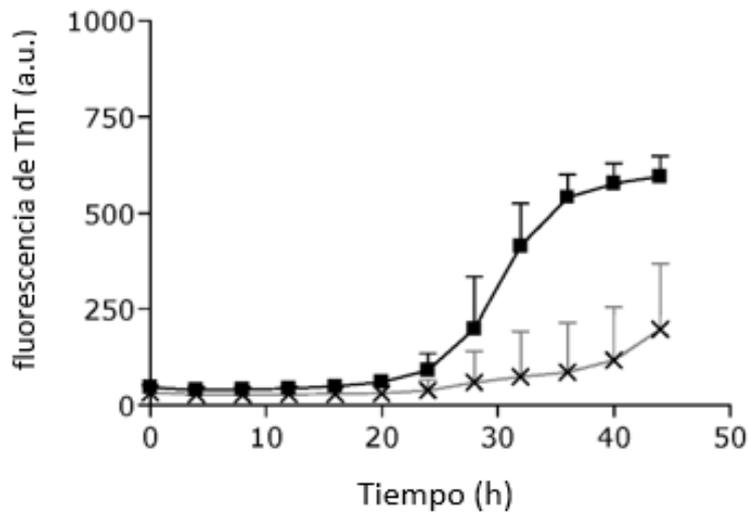
	10 h	SD	40 h	SD
■ Referencia	49	4	658	54
▼ + 200 ppm Poloxámero-188	33	0	34	1

Figura 2



	Tiempo (h)	20 h	SD	40 h	SD
● Referencia		185	139	635	33
× +50 ppm Poloxámero 188		29	1	204	272
▼ +100 ppm Poloxámero 188		28	1	32	3

Figura 3



	20 h	SD	40 h	SD
—■— Referencia	61	8	577	52
—×— + 200 ppm Polisorbato -20	31	8	118	136

Figura 4

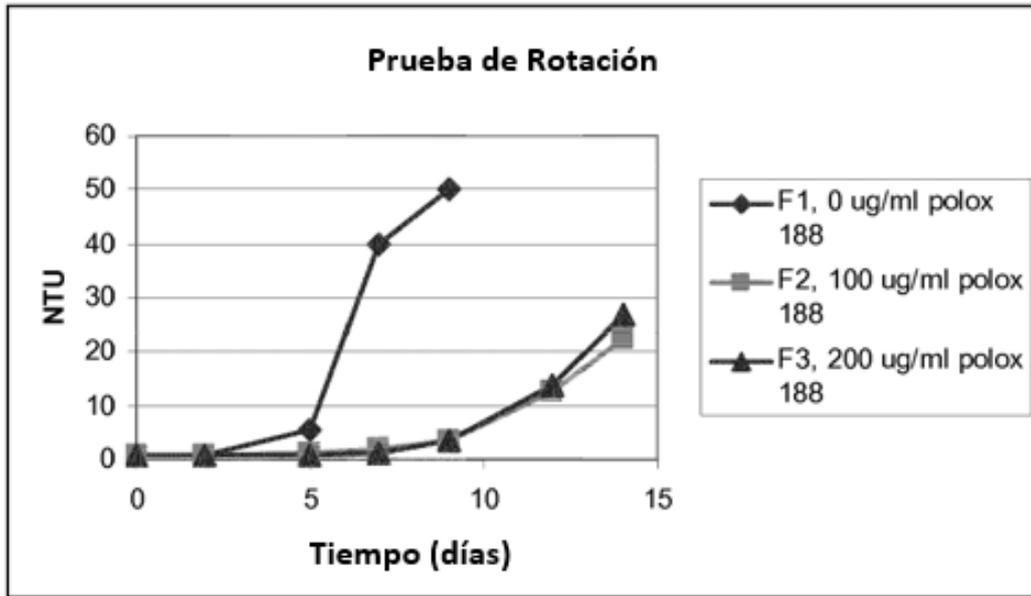


Figura 5

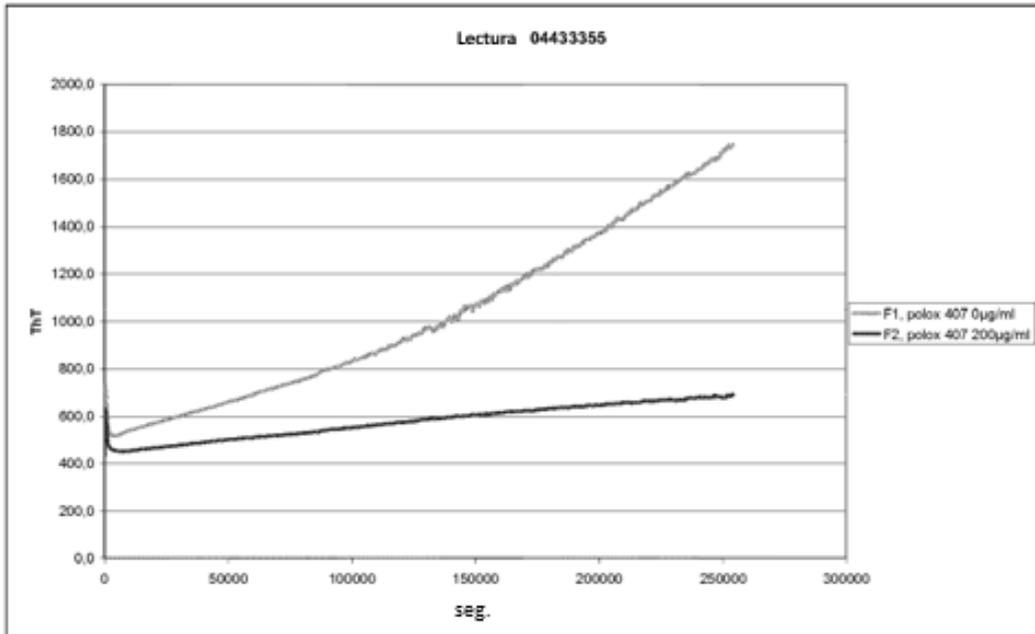


Figura 6

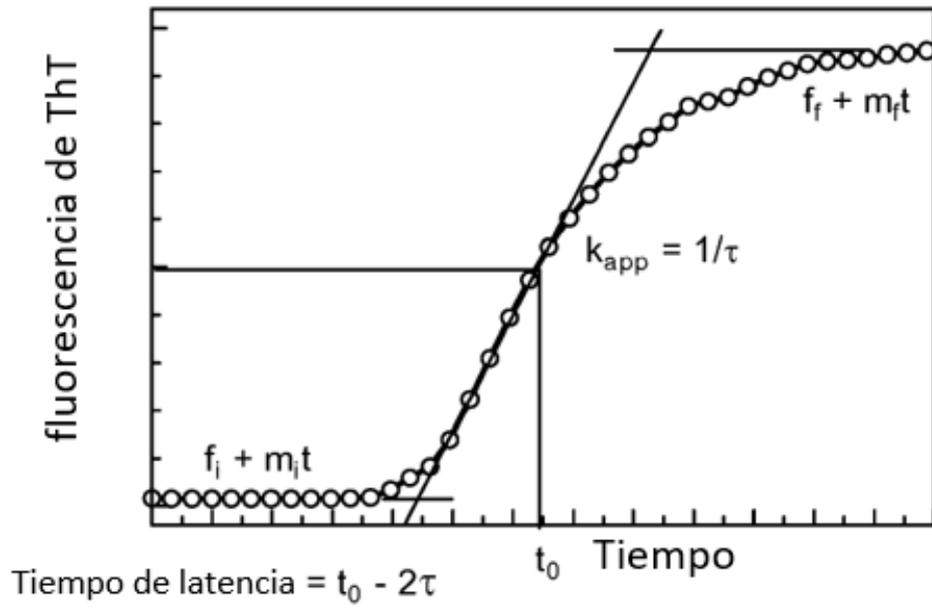


Figura 7

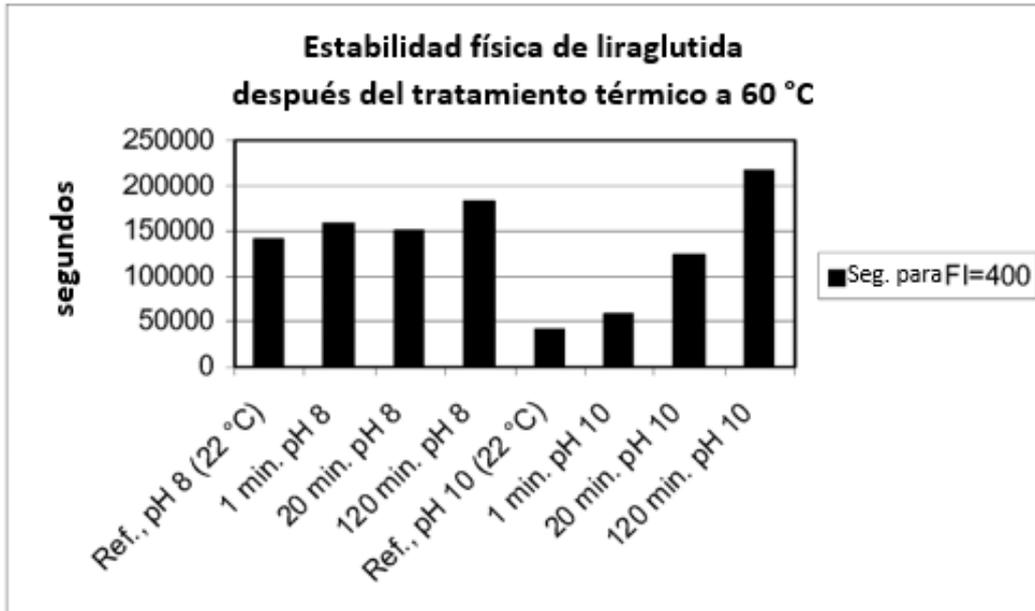


Figura 8

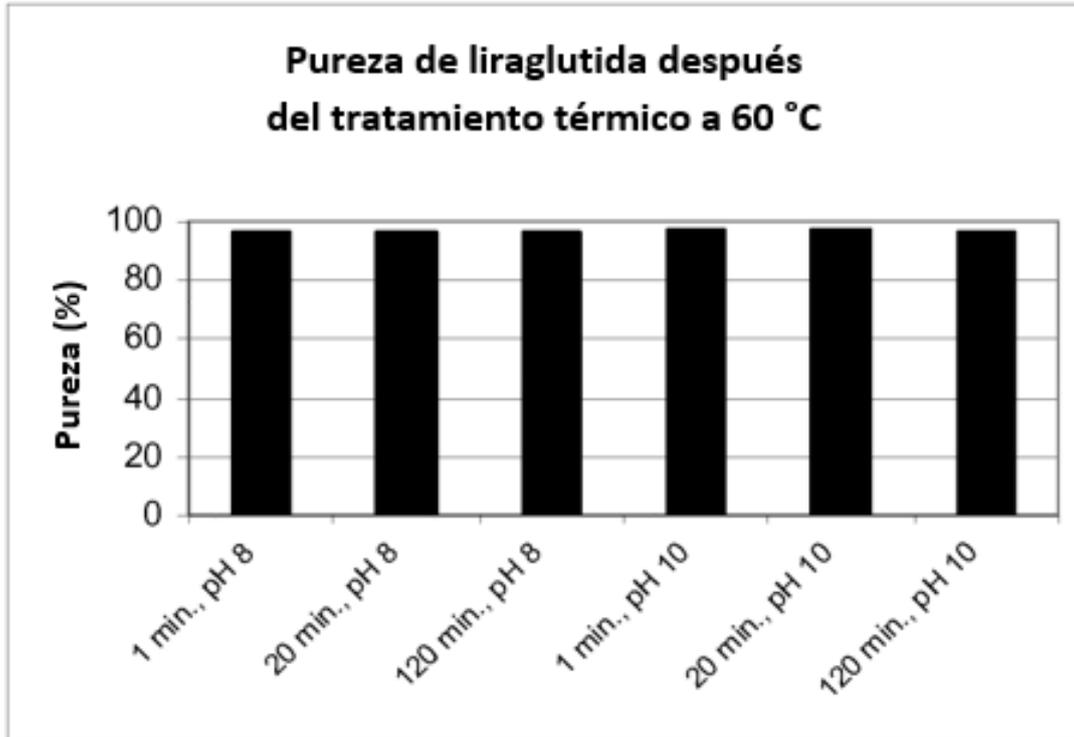


Figura 9

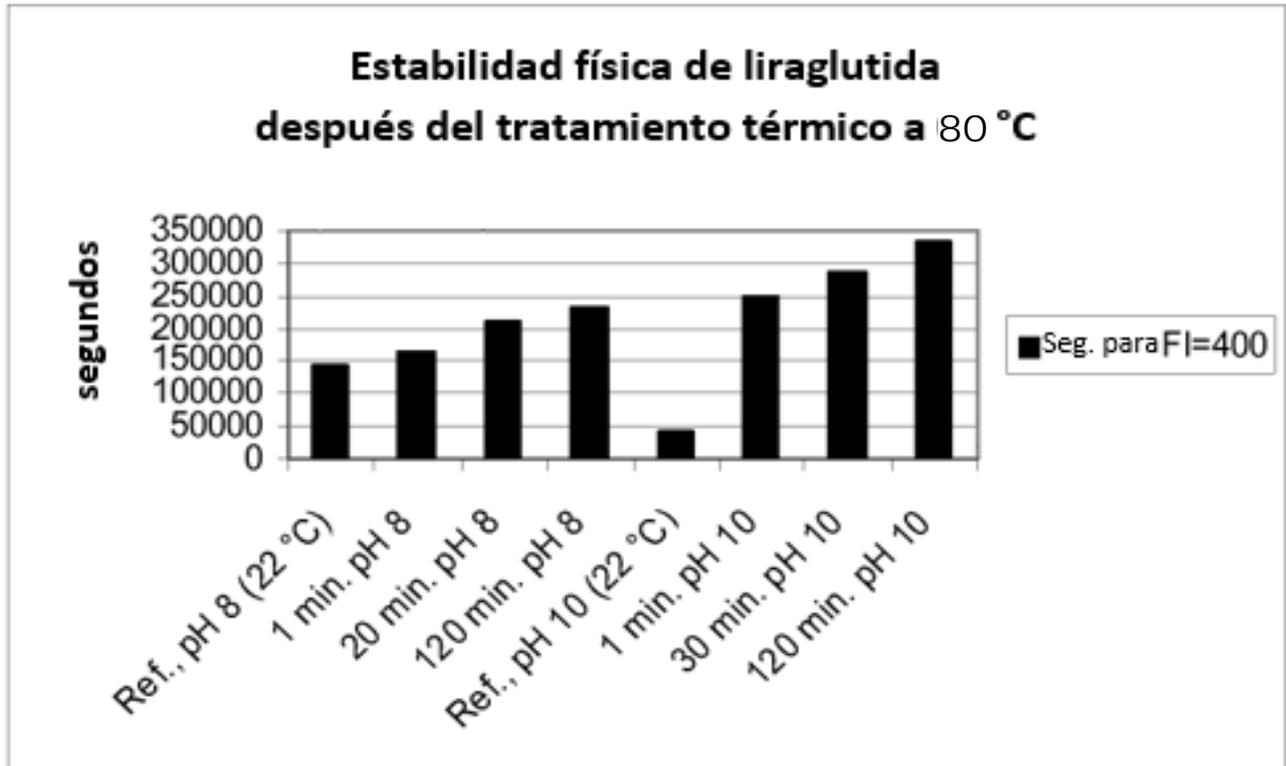


Figura 10

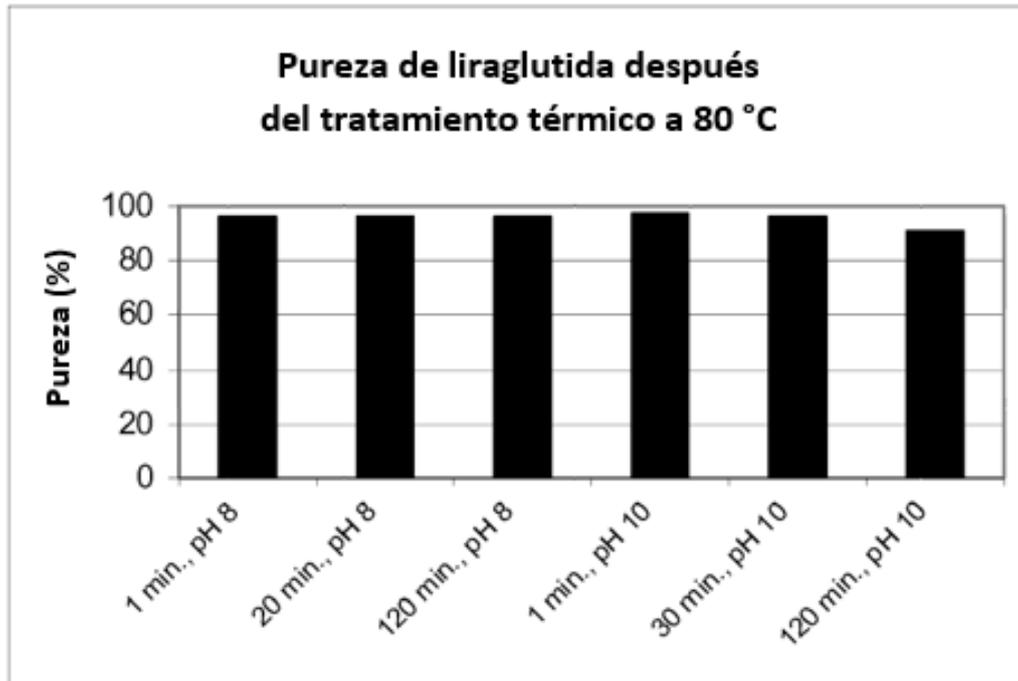


Figura 11

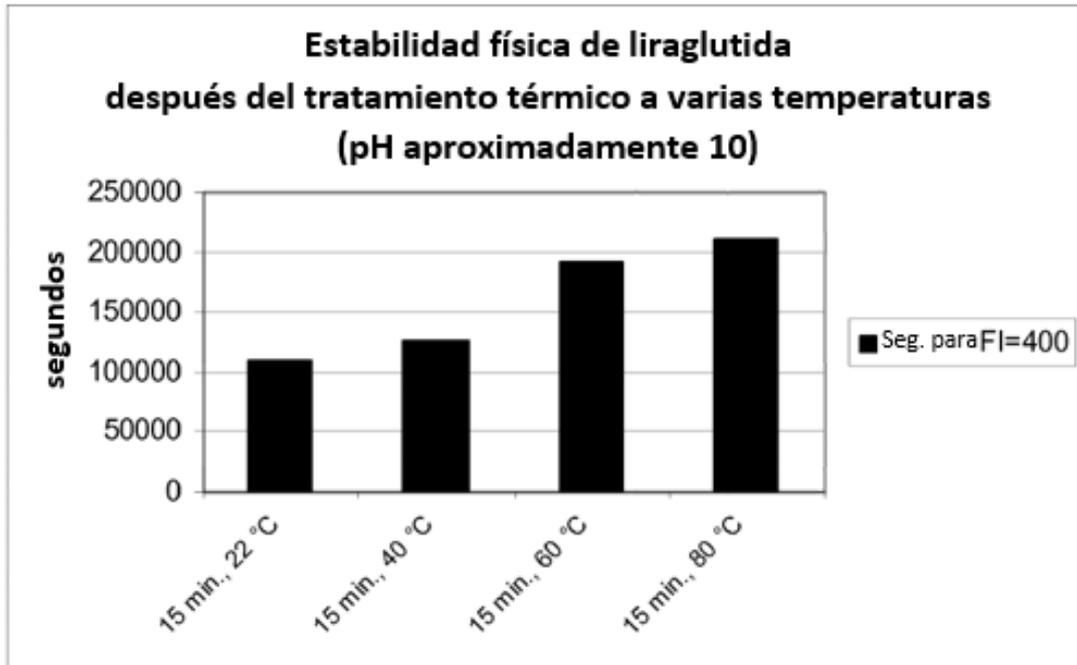


Figura 12

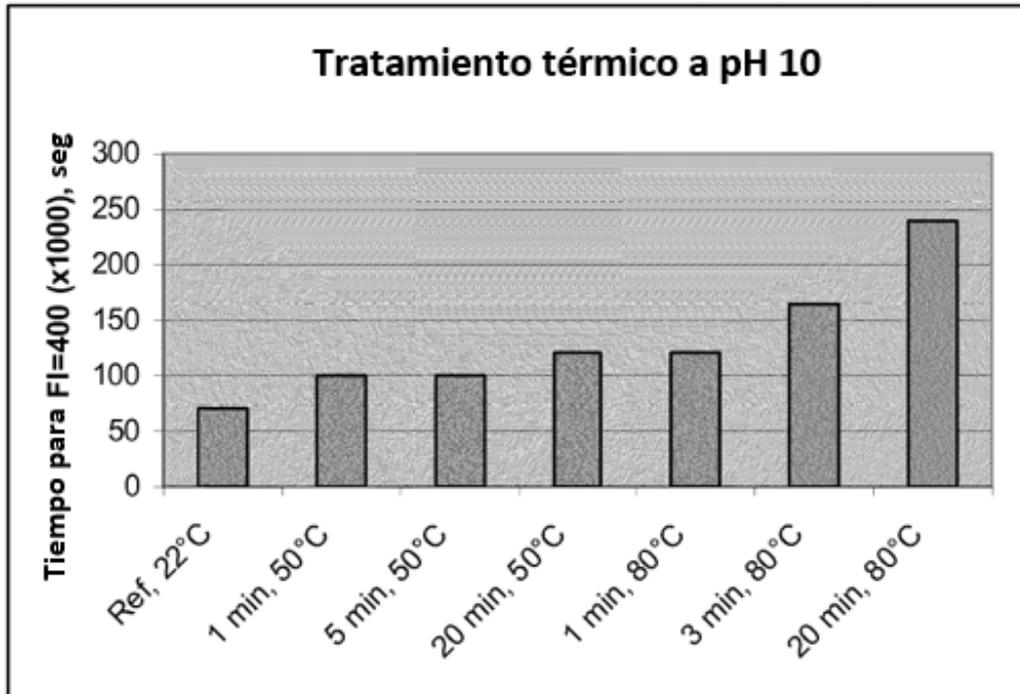


Figura 13

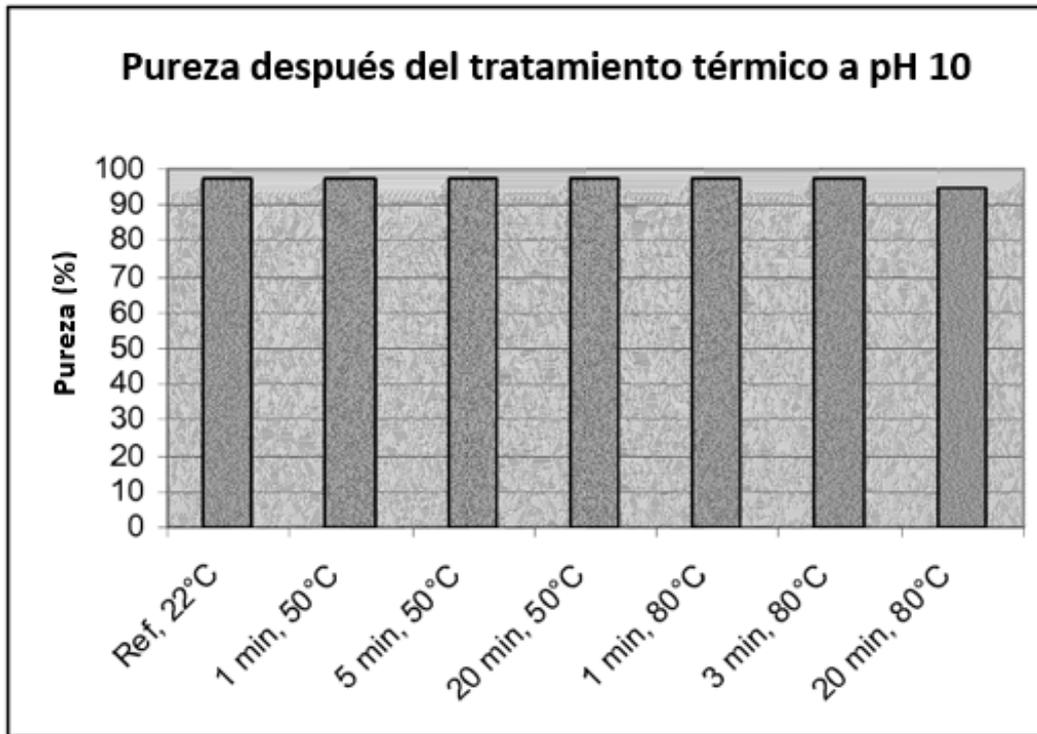


Figura 14

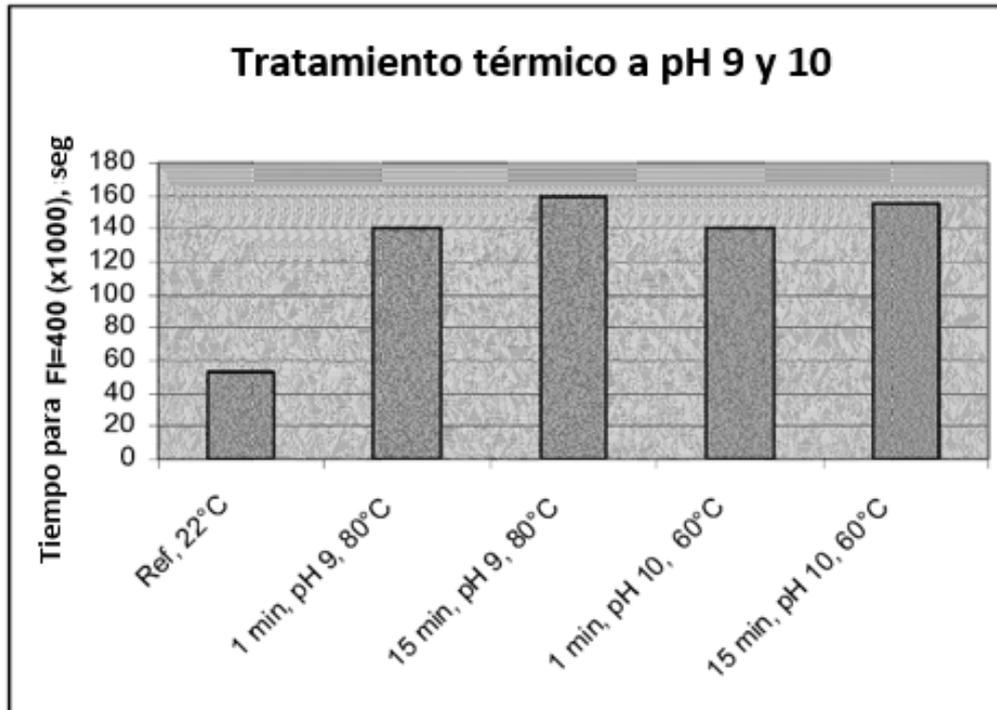


Figura 15

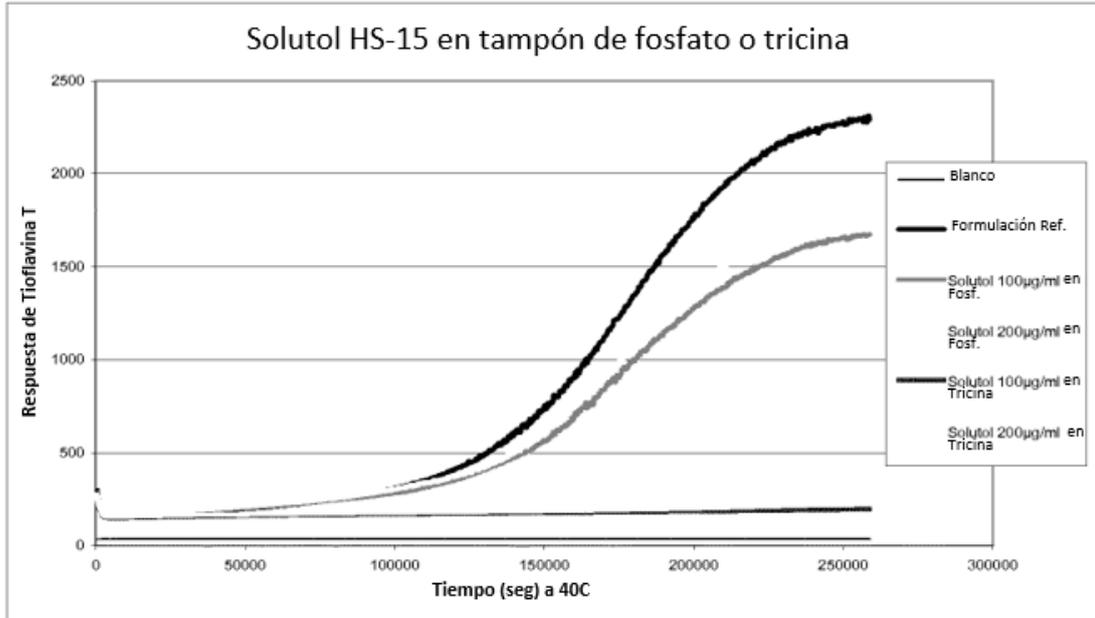


Figura 16

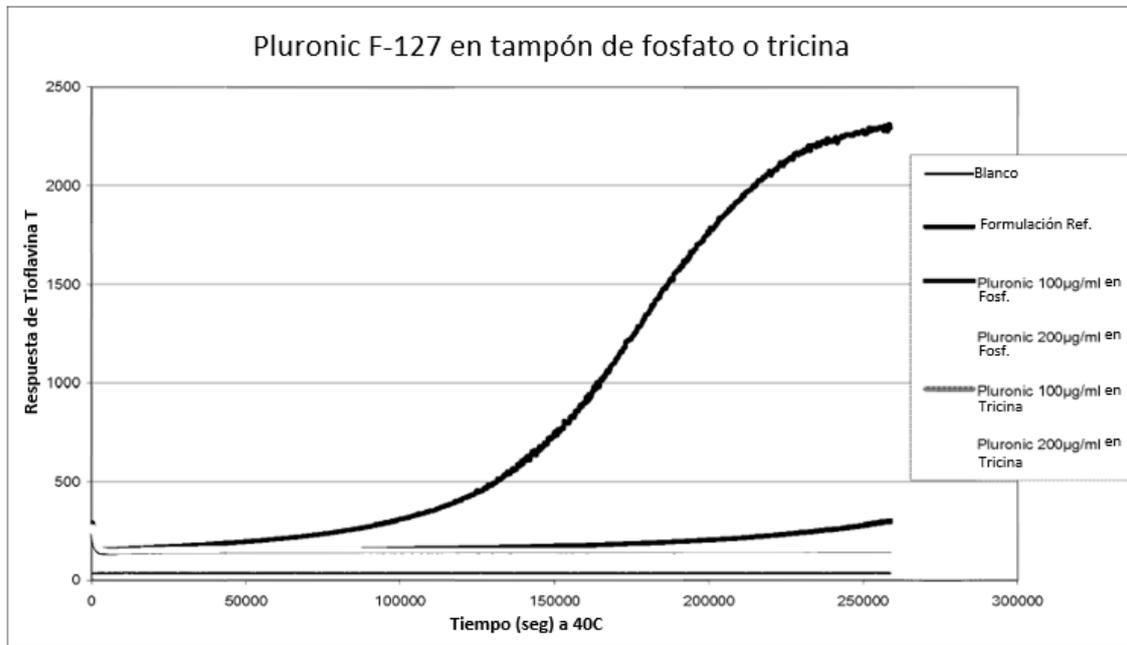


Figura 17

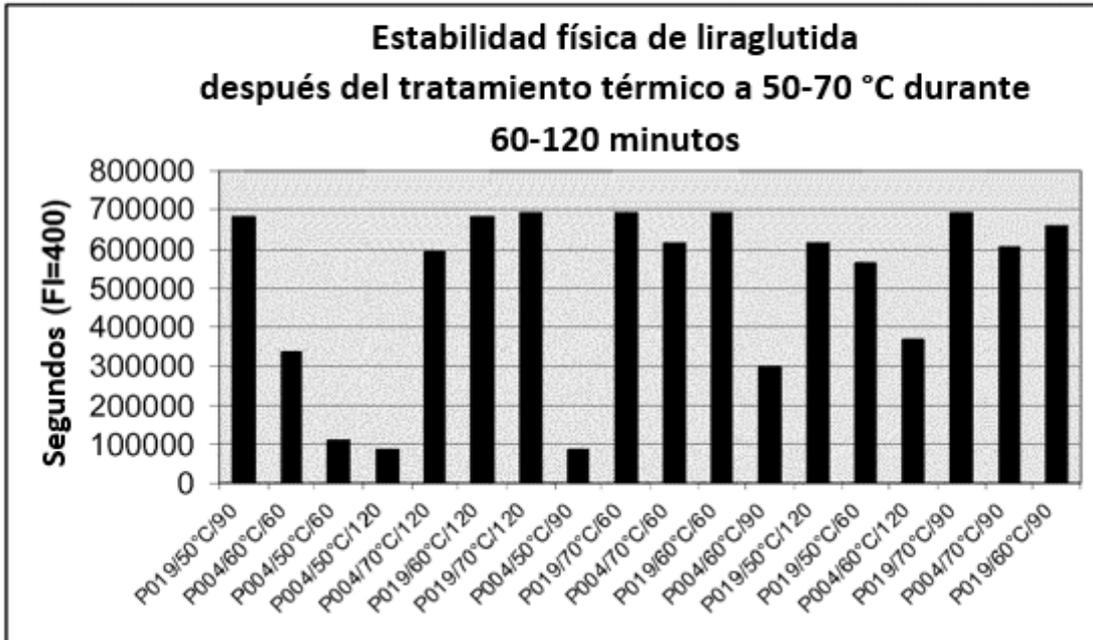


Figura 18

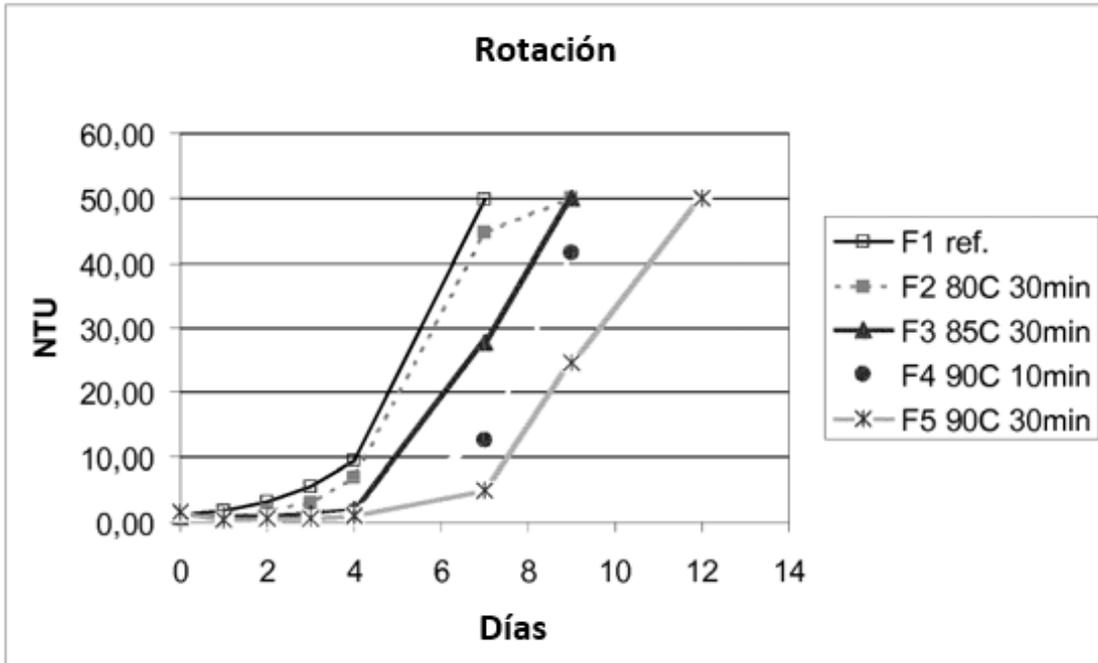


Figura 19

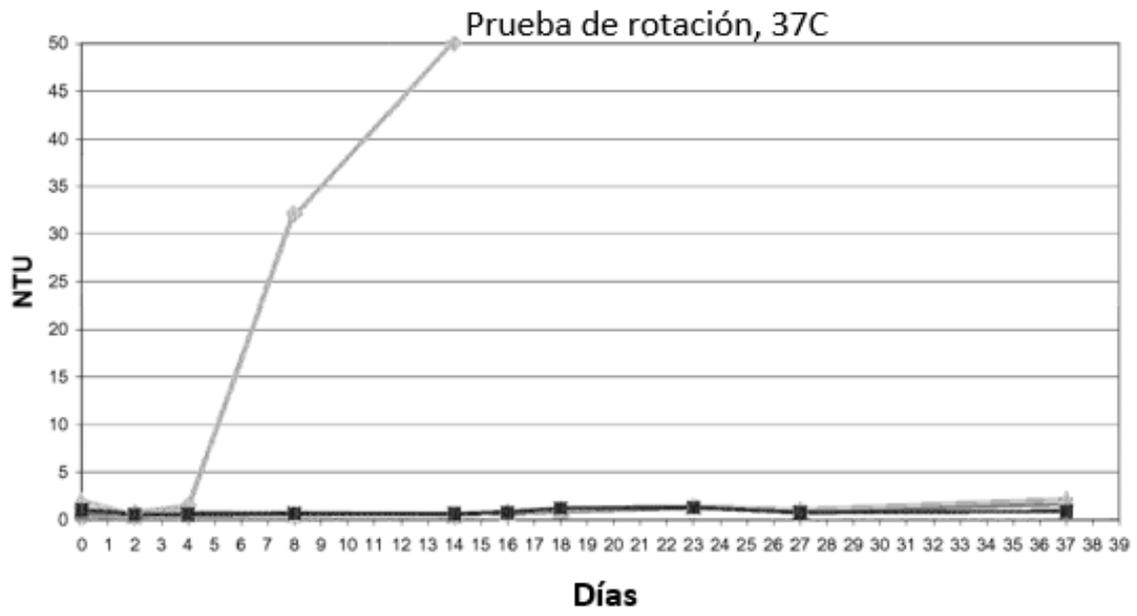


Figura 20

