

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 027 617**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2018** **PCT/EP2018/086167**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2019** **WO19122109**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2018** **E 18830814 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2025** **EP 3727332**

54 Título: **Composición farmacéutica líquida**

30 Prioridad:

21.12.2017 EP 17306875

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

16.06.2025

73 Titular/es:

**SANOFI (100.00%)
46 avenue de la Grande Armée
75017 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**VENCZEL, MARTA;
MEYER, NINO;
KAMM, WALTER;
NAGEL, NORBERT y
BAUMGARTNER, BRUNO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 3 027 617 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

Composición farmacéutica líquida

5 CAMPO DE LA INVENCION

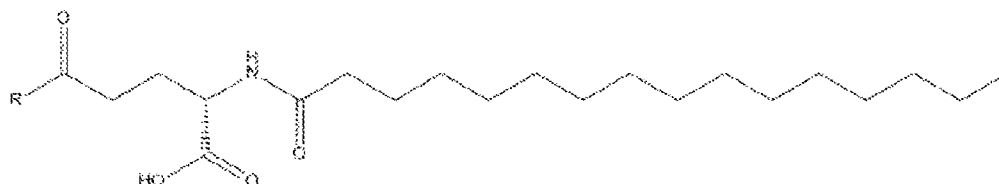
La presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que comprende un péptido de SEQ ID NO.: 2 como principio activo farmacéutico. La composición de la presente invención es adecuada para uso médico en seres humanos, por ejemplo, en el tratamiento de trastornos de un síndrome metabólico o diabetes u obesidad o para la reducción del exceso de ingesta de alimentos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El documento WO 2014/056872 A1 divulga el péptido de SEQ ID NO.: 2:

1 5 10 15 20
H-dSer-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-K (γE-x53) -E-S-K-A-A-Q-D-F-I-E-
25 30 35
W-L-K-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH₂ (SEQ ID NO.: 2)

en el que γE-x53 es (S)-4-carboxi-4-hexadecanoilamino-butilil- tal como se muestra a continuación:



que activa el receptor del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) y el receptor de glucagón. Se proporcionan observaciones generales para una formulación, pero no se proporcionan datos con respecto a la estabilidad a largo plazo de formulaciones específicas.

La liraglutida y una composición farmacéutica de la misma son conocidas públicamente. La liraglutida es un análogo modificado químicamente comercializado del GLP-1 en el que, entre otras modificaciones, un ácido graso está unido a una lisina en la posición 20, lo que da lugar a una duración prolongada de la acción.

La secuencia de aminoácidos de la liraglutida se muestra como SEQ ID NO.: 1:

1 5 10 15 20
H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K ((S)-4-Carboxi-4-
25 30
hexadecanoilamino - butiril-) -E-F-I-A-N-L-V-R-G-R-G-OR
(SEQ ID NO.: 1)

La formulación comercializada de liraglutida comprende el agente activo liraglutida, monohidrogenofosfato de sodio dihidrato, propilenglicol, fenol y agua para inyección a un pH de 8,15 (véase Novo Nordisk Australia: "Product Information Liraglutide Victoza®" y Novo Nordisk Australia: "Product Information Liraglutide Saxenda®, disponibles en línea a través de la versión accesible públicamente del Australian Register of Therapeutic Goods (Registro Australiano de Productos Terapéuticos) (ARTG; consultado el 19 de diciembre de 2017 en la URL <https://www.ebs.tga.gov.au/ebs/picmi/picmirepository.nsf/>

PICMI?OpenForm&t=&q=victoza&r=https://www.ebs.tga.gov.au/ (para Victoza) y <https://www.tga.gov.au/artg/artg-id-225804> (para Saxenda); Rote Liste 2016, página 402). Dos formulaciones de Novo Nordisk, Victoza® y Saxenda®, se mencionan en la "Rote Liste": Victoza® 6 mg/ml solución inyectable en un dispositivo de pluma, (código de acceso de Rote Liste: ATC: A10BX07) y Saxenda® 6 mg/ml solución inyectable en un dispositivo de pluma (código de acceso de Rote Liste: ATC: A10BX07). Ambas formulaciones comprenden el agente activo liraglutida, monohidrogenofosfato de sodio dihidrato, propilenglicol, fenol y agua para inyección.

Estas formulaciones presentan determinadas desventajas debido a la presencia del propilenglicol, por ejemplo debido a que la administración parenteral puede causar dolor o irritación. Además, desde el punto de vista de la tolerabilidad del paciente, el pH alcalino (pH > 8) es desventajoso, teniendo en cuenta que la formulación tiene que inyectarse

diariamente (véase el ID de referencia de la FDA: 3677762, consultado el 19 de diciembre de 2017 en la URL http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/206321orig1s0001b1.pdf; página 10, sección "*Injection site reactions*"). En la misma, se describe que las reacciones más comunes en el sitio de inyección, cada una notificada por del 1% al 2,5% de los pacientes tratados con Saxenda y de forma más común que por los pacientes tratados con placebo, incluyeron eritema, prurito y erupción cutánea en el sitio de inyección.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un objeto de la presente invención era proporcionar una composición líquida estable que comprenda el péptido de SEQ ID NO.: 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Este objeto se logró mediante la formulación del péptido de SEQ ID NO.: 2 (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) con cloruro de sodio como excipiente. En algunos casos, la composición de acuerdo con la invención también se denomina en el presente documento "formulación".

Se ha descubierto, sorprendentemente, que la adición de cloruro de sodio es capaz de mejorar la estabilidad en almacenamiento de una composición de acuerdo con la presente invención que comprende el péptido de SEQ ID NO.: 2. El cloruro de sodio aumenta la estabilidad física de las composiciones de la invención y disminuye la adsorción del principio activo farmacéutico en la pared de los recipientes primarios.

Además, sorprendentemente se ha descubierto que el cloruro de sodio mejora la estabilidad en almacenamiento de las composiciones también mediante la reducción de la formación de proteínas de alto peso molecular y las impurezas totales. Estos parámetros son, individualmente o juntos, una medida de la integridad química de las composiciones.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición líquida que comprende un péptido de SEQ ID NO.: 2 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo farmacéutico, cloruro de sodio como excipiente y un vehículo líquido, en la que la composición comprende además un tampón farmacéuticamente aceptable y en la que la composición tiene un pH de 6,0 a 7,0.

La composición de la invención es estable a un pH fisiológico o un pH ligeramente ácido. La composición de la invención es estable a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, opcionalmente en presencia de un conservante farmacéuticamente aceptable, tal como m-cresol, y en ausencia de disolventes orgánicos, tales como glicerol y propilenglicol. La estabilidad en ausencia de disolventes orgánicos, por ejemplo en ausencia de propilenglicol, es sorprendente en vista del resto hidrófobo y lipófilo unido a la cadena lateral de lisina en la posición 14 de la SEQ ID NO.: 2.

En comparación, la formulación comercializada de liraglutida (Novo Nordisk Victoza®, Saxenda®) tiene un pH alcalino y contiene propilenglicol (véase el Resumen de la EMA de las características del producto Victoza®, consultado el 19 de diciembre de 2017 en la URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001026/WC500050017.pdf (página 15)

y el Resumen de la EMA de las características del producto *Saxenda*®, consultado el 19 de diciembre de 2017 en la URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/HUMAN/003780/WC500185786.pdf (página 16)).

Además, se descubrió una formulación de SEQ ID NO: 2 con m-cresol como conservante microbiológico. El m-cresol tiene una propiedad de unión más alta a la superficie de los péptidos que el fenol. La formulación de liraglutida contiene fenol como conservante microbiológico (Novo Nordisk Victoza®, Saxenda®, véase, por ejemplo, *Interactions Between Peptide and Preservatives: Effects on Peptide Self-Interactions and Antimicrobial Efficiency in Aqueous Multi-dose Formulations*, Pharmaceutical Research, octubre de 2015, Volumen 32, Edición 10, páginas 3201-3212).

Además, se ha descubierto que la ausencia de disolventes orgánicos del vehículo líquido de la composición es ventajosa. En consecuencia, en determinadas formas de realización, el vehículo líquido de la composición de la invención está exento de disolventes orgánicos, particularmente exento de glicerol y/o propilenglicol. Además, se ha descubierto que la ausencia de ajustadores de la tonicidad (distintos del cloruro de sodio) es ventajosa. En consecuencia, en determinadas formas de realización, la composición de la invención está exenta de ajustadores de la tonicidad distintos del cloruro de sodio, tales como manitol.

Además, sorprendentemente se ha descubierto que la composición de acuerdo con la invención se puede preparar, por ejemplo, con un vehículo líquido acuoso en ausencia de tensioactivos, a pesar de la presencia de un resto lipófilo unido al grupo ϵ -NH₂ de un residuo de lisina en el péptido de SEQ ID NO.: 2. En consecuencia, en determinadas formas de realización, la composición de la invención está exenta de tensioactivos, particularmente polisorbatos y/o poloxámeros.

Por lo tanto, se ha descubierto que la composición líquida descrita en el presente documento tiene suficiente estabilidad, es decir, actividad biológica, integridad química y/o integridad física después del almacenamiento, para proporcionar una vida útil (es decir, un periodo de tiempo durante el cual la composición puede almacenarse sin deteriorarse y sigue siendo adecuada para su uso), particularmente en un recipiente cerrado, de al menos un mes, particularmente al menos tres meses, más particularmente al menos seis meses, a una temperatura de +5 °C, +25 °C o +37 °C. En determinadas formas de realización, la composición líquida comprende un péptido de SEQ ID NO.: 2, cloruro de sodio y m-cresol, pero está exenta de disolventes orgánicos y tensioactivos. La compatibilidad de estos diferentes compuestos, que da como resultado una alta actividad biológica, integridad química y/o integridad física, fue sorprendente.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso médico de la composición reivindicada. Las indicaciones médicas de interés son, por ejemplo, trastornos de un síndrome metabólico o diabetes u obesidad o su uso para la reducción de la ingesta de alimentos en exceso. En formas de realización específicas, la composición reivindicada es para su uso en un procedimiento para tratar diabetes mellitus, por ejemplo, diabetes mellitus de tipo II, y/o para su uso en un procedimiento para tratar la obesidad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La composición de la presente invención comprende un péptido de SEQ ID NO.: 2 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo farmacéutico.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" significa sales de los compuestos de la invención que son seguras y eficaces para su uso en seres humanos. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir, pero sin limitación, sales de adición de ácidos y sales básicas.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la invención proporciona una composición líquida que comprende un péptido de SEQ ID NO.: 2 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo farmacéutico, cloruro de sodio como excipiente y un vehículo líquido, en la que la composición comprende además un tampón farmacéuticamente aceptable y en la que la composición tiene un pH de 6,0 a 7,0.

En una forma de realización de la composición de la invención, el principio activo farmacéutico puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, por ejemplo en una cantidad de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 10 mg/ml sobre la base del peso del péptido de SEQ ID NO.: 2. En una forma de realización adicional, el principio activo farmacéutico puede estar presente en una cantidad de 1 µg/ml a 75 mg/ml, por ejemplo en una cantidad de 1 µg/ml a 10 mg/ml sobre la base del peso del péptido de SEQ ID NO.: 2. En otra forma de realización, el principio activo farmacéutico está presente en una cantidad de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml.

Se ha descubierto que el cloruro de sodio aumenta la estabilidad en almacenamiento de la composición a diferencia de otros ajustadores de la tonicidad tales como manitol y/o glicerol. En formas de realización particulares, el cloruro de sodio está presente en una cantidad de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 9 mg/ml, más particularmente en una cantidad de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 9 mg/ml, e incluso más particularmente en una cantidad de 6,0 mg/ml a aproximadamente 6,5 mg/ml, tal como 6,30 mg/ml.

La composición puede comprender además un conservante farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, fenol y/o m-cresol, particularmente m-cresol. La cantidad de m-cresol es normalmente de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, particularmente de aproximadamente 3,0 mg/ml a aproximadamente 3,5 mg/ml, tal como 3,15 mg/ml.

La composición de acuerdo con la presente invención comprende además un tampón farmacéuticamente aceptable. Particularmente, el tampón farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en un tampón de fosfato, un tampón de citrato y un tampón de fosfato-citrato en diferentes formas de hidrato y/o solvato, tales como anhidrato, monohidrato, dihidrato, heptahidrato, octahidrato y dodecahidrato.

En determinadas formas de realización, la composición comprende un tampón de fosfato, particularmente un tampón de fosfato de sodio. El tampón de fosfato puede elaborarse *in situ* mezclando ácido fosfórico e hidróxido de sodio, o puede estar compuesto por una sal de dihidrogenofosfato y una sal de monohidrogenofosfato, por ejemplo, dihidrogenofosfato de sodio dihidrato e hidrogenofosfato de disodio dodecahidrato. El tampón de fosfato, posiblemente junto con cualquier otra sal de fosfato, está normalmente presente en una concentración de aproximadamente 5 mM a 100 mM, por ejemplo de 5 mM a 100 mM, tal como 30 mM. El tampón de fosfato normalmente tiene un pH de 5,8 a 8,0, tal como de 6,0 a 7,4.

Si está presente, la composición puede comprender los materiales tampón, por ejemplo, dihidrogenofosfato de sodio dihidrato e hidrogenofosfato de disodio dodecahidrato, en diferentes relaciones molares que varían de aproximadamente 5:1 a 1:5, o de aproximadamente 2:1 a 1:2, dependiendo del valor de pH deseado de la composición.

Por ejemplo, la relación molar de los materiales tampón cuando se usa un tampón de fosfato, por ejemplo un tampón de fosfato de dos componentes, tal como dihidrogenofosfato de sodio dihidrato e hidrogenofosfato de disodio dodecahidrato, puede ser de aproximadamente 5:3, 5:2, 5:1, 1:5, 2:5, o 3:5, particularmente de aproximadamente 2:1 o de aproximadamente 1:2 o de aproximadamente 1:1. En una forma de realización, la relación molar de dihidrogenofosfato de sodio dihidrato e hidrogenofosfato de disodio dodecahidrato puede ser de 5:3, 5:2, 5:1, 1:5, 2:5, 2:5, o 3:5, particularmente de 2:1 o 1:2. En otra forma de realización, la relación molar de dihidrogenofosfato de sodio dihidrato e hidrogenofosfato de disodio dodecahidrato puede ser de 1:1,8.

En otras formas de realización, la composición comprende un tampón de citrato de sodio. El tampón de citrato puede elaborarse *in situ* mezclando ácido cítrico e hidróxido de sodio, o puede estar compuesto por un ácido cítrico monohidrato y un citrato trisódico, por ejemplo citrato trisódico anhidrato o dihidrato. El tampón de citrato está normalmente presente en una concentración de aproximadamente 5 mM a 100 mM, por ejemplo de 5 mM a 100 mM, tal como 30 mM. El tampón de citrato normalmente tiene un pH de 3,0 a 7,0, tal como de 4,5 a 6,6.

Si están presente, la composición puede comprender los materiales tampón, por ejemplo ácido cítrico y citrato trisódico, en diferentes relaciones molares que varían de aproximadamente 5:1 a 1:5, o de 2:1 a 1:2, dependiendo del valor de pH deseado de la composición.

En otras formas de realización preferidas, la composición comprende un tampón de fosfato-citrato. El tampón de fosfato-citrato puede elaborarse mezclando ácido cítrico y hidrogenofosfato de disodio, o puede estar compuesto por un ácido cítrico anhidrato o monohidrato e hidrogenofosfato de disodio anhidrato, dihidrato, heptahidrato, octahidrato o dodecahidrato. El tampón de fosfato-citrato está normalmente presente en una concentración de aproximadamente 5 mM a 100 mM, por ejemplo de 5 mM a 100 mM, tal como 30 mM. El tampón de citrato normalmente tiene un pH de 3,0 a 7,0, tal como de 4,5 a 6,6.

Si están presente, la composición puede comprender los materiales tampón, por ejemplo ácido cítrico e hidrogenofosfato de disodio, en diferentes relaciones molares que varían de aproximadamente 5:1 a 1:5, o de 2:1 a 1:2, dependiendo del valor de pH deseado de la composición.

La composición de la presente invención tiene preferentemente un pH de fisiológico a ligeramente ácido. El pH de la composición de la presente invención es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0, particularmente de aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,9, tal como un pH de aproximadamente 6,6. El pH se puede ajustar mediante la selección apropiada de un ajuste de pH de tampón usando un ácido farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico (HCl) y/o una base tal como hidróxido de sodio (NaOH).

La composición de la invención comprende un vehículo líquido. Normalmente, el vehículo líquido es un líquido acuoso, particularmente agua. Normalmente, el vehículo líquido está sustancialmente exento de disolventes orgánicos. En el contexto de la presente invención, el término "disolvente orgánico" se refiere a una clase de compuestos comúnmente utilizados en la industria farmacéutica para disolver ingredientes farmacéuticos. Normalmente tienen bajo peso molecular, son lipófilos y volátiles, y son líquidos a temperatura ambiente. Comprenden tanto compuestos alifáticos como compuestos aromáticos. Como ejemplo se pueden mencionar alcoholes tales como etanol, glicerol, propilenglicol, etc. El propilenglicol se define como un disolvente orgánico en el contexto de la presente invención, aunque a veces se usa como un ajustador de la tonicidad en la técnica.

En el contexto de la presente invención, el término "sustancialmente exento de" significa que una composición respectiva contiene menos del 5% (p/p), menos del 2,5% (p/p) o menos del 1% (p/p) de un compuesto dado. Un "compuesto" en el contexto de la invención es cualquier sustancia química compuesta por moléculas idénticas que consisten en átomos de dos o más elementos químicos. Por ejemplo, cuando el compuesto dado es propilenglicol, una composición sustancialmente exenta de propilenglicol contendrá menos del 5% (p/p), menos del 2,5% (p/p) o menos del 1% (p/p) de propilenglicol.

Más particularmente, el vehículo líquido está exento de disolventes orgánicos tales como glicerol y propilenglicol. En el contexto de la presente invención, el término "exento de" significa que una composición respectiva contiene menos del 0,01% (p/p), particularmente menos del 0,001% (p/p) de un compuesto dado. Se pretende que, cuando el vehículo líquido esté exento de disolventes orgánicos, toda la composición líquida esté exenta de disolventes orgánicos.

En formas de realización particulares, la composición de la presente invención está sustancialmente exenta o exenta de tensioactivos tales como un alcohol polihidroxílico o ésteres y éteres del mismo. La composición de acuerdo con la presente invención está más particularmente exenta de ésteres de ácidos grasos y éteres de glicerol y sorbitol tales como Span®, Tween®, Myrj®, Brij®, Cremophor®.

Además, las composiciones de acuerdo con la presente invención están particularmente exentas de polioles seleccionados del grupo que consiste en polipropilenglicoles, polietilenglicoles, polisorbatos, poloxámeros, plurónicos y tetrónicos. Más particularmente, la composición de acuerdo con la presente invención está exenta de polisorbatos y/o poloxámeros.

Más particularmente, la composición de acuerdo con la presente invención está sustancialmente exenta, preferentemente exenta, de polisorbatos, tales como, por ejemplo, polisorbato 20 y/o polisorbato 80.

5 Más particularmente, la composición de acuerdo con la presente invención está sustancialmente exenta, preferentemente exenta, de poloxámeros, tales como, por ejemplo, poloxámero 188.

En determinadas formas de realización, la composición está exenta de polisorbatos y poloxámeros.

10 Además, la composición de la invención puede estar exenta de ajustadores de la tonicidad diferentes del cloruro de sodio. La expresión "ajustador de la tonicidad" o "agente de tonicidad" dentro de la presente invención se refiere a compuestos que pueden hacer que las composiciones líquidas sean isotónicas con respecto a determinadas membranas (por ejemplo, de células sanguíneas o de tejido cardiovascular), de modo que, por ejemplo, se pueda prevenir el daño a las células sanguíneas o al tejido cardiovascular, cuando la composición se aplica por vía intravenosa. Por ejemplo, la composición está, en determinadas formas de realización, sustancialmente exenta o
15 exenta de glicerol, dextrosa, lactosa, sorbitol y manitol. Particularmente, la composición está exenta de manitol.

En determinadas formas de realización, la composición está sustancialmente exenta o exenta de manitol y propilenglicol (analizados anteriormente en "disolventes orgánicos").

20 La composición de la invención es físicamente y químicamente estable durante al menos 2 años con y sin adición de tensioactivos, por ejemplo poloxámeros, y/o ajustadores de la tonicidad tales como manitol, y/o disolventes orgánicos tales como propilenglicol.

25 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición que muestra integridad biológica, química y/o física del agente activo (principio(s) activo(s) farmacéutico(s) o API), es decir, un péptido de SEQ ID NO.: 2, una sal farmacéuticamente aceptable de SEQ ID NO.: 2, o una combinación de un péptido de SEQ ID NO.: 2 y al menos una sal farmacéuticamente aceptable del mismo después de un almacenamiento, por ejemplo, después de un almacenamiento de un mes, tres meses, seis meses, nueve meses, doce meses o veinticuatro meses a una temperatura de +5 °C o después de un almacenamiento de un mes, tres meses o seis meses a una temperatura de
30 +25 °C.

En la presente solicitud, el término "actividad biológica" significa la actividad del péptido de SEQ ID NO.: 2, que se utiliza en la composición de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos para determinar la actividad de un agonista del receptor de GLP-1 son conocidos por un experto en la técnica

35 Más particularmente, la composición de acuerdo con la presente invención tiene, después de un almacenamiento de 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses o 24 meses a una temperatura de +5 °C o +25 °C, una actividad biológica de al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% de la actividad al inicio del almacenamiento.

40 En particular, la composición de acuerdo con la presente invención tiene una actividad biológica de agonistas del receptor de GLP-1 y del glucagón de al menos el 80% o al menos el 90% después de un almacenamiento de 12 meses a +5 °C, particularmente de 24 meses a +5 °C.

45 Más particularmente, la composición de acuerdo con la presente invención muestra integridad química después de un almacenamiento de 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses o 24 meses. En el contexto de la presente divulgación, la integridad química a veces también se denomina estabilidad química. Integridad química significa, más particularmente, que después del almacenamiento a una temperatura de +5 °C, +25 °C o +37 °C, la composición comprende al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% de la sustancia activa (API)), en comparación con el inicio del almacenamiento, en una forma sustancialmente sin cambios químicos.

50 Integridad química puede significar una proporción muy baja de proteínas de alto peso molecular en la composición de acuerdo con la presente invención. La proporción de proteínas de alto peso molecular con respecto a la masa total del péptido de SEQ ID NO.: 2 presente en la composición después del un almacenamiento de 18 meses a +5 °C, de 6 meses a +25 °C y/o de 1 mes a +37 °C es preferentemente inferior al 2% en peso. La cantidad de proteínas de alto peso molecular se puede determinar, por ejemplo, utilizando cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC).

60 Más particularmente, la composición de acuerdo con la presente invención presenta integridad física después de un almacenamiento de 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses o 24 meses. En el contexto de la presente divulgación, la integridad física a veces también se denomina estabilidad física. Integridad física significa, más particularmente, que después del almacenamiento a una temperatura de +5 °C, +25 °C o +37 °C, la composición comprende al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% del principio activo, en comparación con el inicio del almacenamiento, en una forma sustancialmente sin cambios físicos.

65

Integridad física puede significar que el péptido de SEQ ID NO.: 2 no forma agregados, tales como, por ejemplo, fibrillas. En algunos aspectos, la composición farmacéutica está exenta de agregados, en aspectos particulares exenta de agregados covalentes más grandes no deseados.

5 Se sabe que los oligómeros existen como oligómeros covalentes, que también se denominan proteínas de alto peso molecular y que normalmente son indeseables, y oligómeros no covalentes unidos a la estructura cuaternaria de un péptido.

10 Las proteínas de alto peso molecular son normalmente dímeros o trímeros del péptido, que pueden formarse, por ejemplo, por medio de reacciones de transamidación intermoleculares después de la formación de un intermedio de anhídrido cíclico o por otros mecanismos.

15 Los agregados de proteínas son normalmente conjuntos grandes de muchas proteínas plegadas deficientemente, que se agrupan entre sí. Puede producirse una falta de plegamiento o un plegamiento deficiente de las proteínas si la proteína en solución está expuesta a tensiones tales como calor, tensión mecánica o superficies hidrófobas. El mecanismo de formación asumido de los agregados es que las porciones hidrófobas expuestas de la proteína interactúan y se unen a los parches hidrófobos expuestos de otras proteínas. Los representantes más prominentes de agregados de proteínas son las fibrillas amiloides, que tienen un núcleo estructurado, pero también se conocen agregados amorfos.

20 En el contexto de la presente solicitud, los oligómeros no covalentes unidos a la estructura cuaternaria de un péptido no se consideran "agregados" o "proteínas de alto peso molecular". Los oligómeros no covalentes se pueden caracterizar, por ejemplo, mediante dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) que proporciona información sobre el tamaño y la forma del oligómero. La presencia o ausencia de agregados se puede determinar, por ejemplo, mediante dispersión de luz dinámica (DLS) para supervisar el diámetro hidrodinámico.

25 En solución en condiciones de formulación tal como se especifican en el presente documento, la SEQ ID NO.: 2 puede, por ejemplo, formar una estructura cuaternaria mediante enlaces no covalentes. Este es un efecto reversible que es común y bien conocido para las proteínas. Por ejemplo, también se sabe que la liraglutida y la mayor parte de las insulinas comercializadas están presentes como oligómeros físicamente unidos en sus respectivas formulaciones de solución.

30 Por otro lado, se mostraron niveles consistentemente bajos de oligómeros unidos covalentemente (proteínas de alto peso molecular) en estudios de estabilidad (véanse los ejemplos).

35 Las investigaciones de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) realizadas en una fuente luminosa de sincrotrón (DESY Hamburg) pueden proporcionar información sobre el tamaño y la forma del oligómero. El mejor ajuste entre la curva de dispersión de rayos X de ángulo pequeño observada experimentalmente y la calculada se puede obtener usando un modelo en el que la SEQ ID NO.:2 es totalmente hexamérica en las formulaciones. Totalmente hexamérica significa que todas las moléculas peptídicas están dispuestas en oligómeros físicos que contienen 6 moléculas de SEQ ID NO.: 2. Además, se realizaron investigaciones complementarias mediante dispersión de luz dinámica con el producto farmacéutico para supervisar el diámetro hidrodinámico de aproximadamente 6 nanómetros.

40 En resumen, las investigaciones muestran la ausencia de agregados covalentes más grandes no deseados en la sustancia farmacológica (API) y formulaciones ilustrativas de acuerdo con la presente invención. Los niveles bajos de proteínas de alto peso molecular se consideran un atributo de calidad, que se controla rutinariamente.

45 En algunas formas de realización, la composición de la invención comprende (a) un péptido de SEQ ID NO.:2 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, (b) un tampón de fosfato de sodio de pH 6,0 a 6,9, un tampón de citrato de pH 4,5 a 6,6, o un tampón de fosfato-citrato de pH 4,5 a 6,6, particularmente un tampón de fosfato de sodio de aproximadamente un pH de 6,5 a 6,7, (c) m-cresol, (d) cloruro de sodio y (e) agua.

50 En algunas formas de realización, la composición de la invención consiste esencialmente en (a) un péptido de SEQ ID NO.:2 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, (b) un tampón de fosfato de sodio de pH 6,0 a 6,9, un tampón de citrato de pH 4,5 a 6,6, o un tampón de fosfato-citrato de pH 4,5 a 6,6, particularmente un tampón de fosfato de sodio de aproximadamente un pH de 6,5 a 6,7, (c) m-cresol, (d) cloruro de sodio y (e) agua.

55 Por "que consiste esencialmente en" se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la expresión, y se limita a incluir otros elementos que no interfieren con la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados ni contribuyen a la misma. Por lo tanto, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no dependiendo de si afectan o no materialmente a la actividad o acción de los elementos enumerados.

En formas de realización específicas, la composición de la invención consiste en (a) un péptido de SEQ ID NO.:2 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, (b) un tampón de fosfato de sodio de pH 6,0 a 6,9, particularmente un tampón de fosfato de sodio de aproximadamente un pH de 6,5 a 6,7, (c) m-cresol, (d) cloruro de sodio y (e) agua.

5 En determinadas formas de realización preferidas de la invención, la composición de la invención consiste en (a) un péptido de SEQ ID NO.:2 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, (b) un tampón de fosfato de sodio de pH 6,2 a 6,9, particularmente un tampón de fosfato de sodio de aproximadamente un pH de 6,5 a 6,7, (c) m-cresol, (d) cloruro de sodio y (e) agua.

10 En determinadas formas de realización preferidas, la composición de la presente invención consiste en (a) un péptido de SEQ ID NO.:2 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml, (B) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ en una cantidad de 3,03 mg/ml y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ en una cantidad de 3,77 mg/ml, (c) m-cresol en una cantidad de 3,15 mg/ml, (d) cloruro de sodio en una cantidad de 6,30 mg/ml, (e) opcionalmente NaOH y/o HCl a pH 6,6, y (f) agua, particularmente agua para inyección.

15 En la presente solicitud, "aproximadamente" significa que los constituyentes pueden estar presentes, por ejemplo, dentro de los intervalos de $\pm 5\%$, $\pm 10\%$ o $\pm 20\%$, particularmente $\pm 5\%$, alrededor de los valores especificados en las composiciones de acuerdo con la presente invención.

20 La composición de la presente invención puede comprender el péptido de SEQ ID NO.: 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como único principio activo.

25 En determinadas formas de realización, la composición líquida tal como se reivindica en el presente documento presenta actividad biológica, integridad química e integridad física del o de los principios activos después del almacenamiento.

La composición líquida de la presente invención se puede preparar para su uso en aplicaciones farmacéuticas adecuadas. Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden estar en forma de una o más unidades de administración.

30 Cada una de las unidades de administración mencionadas anteriormente de la composición farmacéutica de la invención se puede proporcionar en un envase para facilitar el transporte y el almacenamiento. Las unidades de administración se envasan en envases estándar monodosis o multidosis, dependiendo su forma, material y estructura del tipo de unidades preparadas. Las formulaciones líquidas se pueden envasar en unidades individuales, tales como por ejemplo viales, cartuchos, jeringas/jeringas precargadas, bolsas de infusión, bolsas de plástico colapsables, botellas de infusión, botellas selladas rellenas por soplado, o tubos de infusión, o en forma inyectable de dosis única o múltiple, por ejemplo en forma de dispositivo de pluma, bomba, o jeringa, y las unidades envasadas individualmente pueden envasarse en recipientes de envases múltiples. Un solo envase puede comprender solo una o una pluralidad de unidades de administración. El envase puede estar fabricado, por ejemplo, de papel, cartón, cartón, plástico, metal, combinaciones o laminados de uno o más de papel, plástico y metal, o vidrio. Algunos ejemplos de formas de realización son botellas de vidrio o plástico que contienen, por ejemplo, una solución, o viales, cartuchos, jeringas, bolsas de infusión, botellas de infusión, tubos de infusión o ampollas que contienen una solución o suspensión.

45 En determinadas formas de realización, las unidades de administración se pueden proporcionar junto con un dispositivo para la aplicación, por ejemplo junto con una jeringa, una pluma de inyección, o un autoinyector. Dichos dispositivos pueden proporcionarse separados de una composición farmacéutica, o precargados con la composición farmacéutica.

50 Un "dispositivo de inyección de tipo pluma", a menudo denominado brevemente "pluma de inyección", es normalmente un dispositivo de inyección que tiene una forma alargada que se asemeja a una pluma estilográfica para escribir. Aunque dichas plumas suelen tener una sección transversal tubular, fácilmente podrían tener una sección transversal diferente, tal como triangular, rectangular, o cuadrada, o cualquier variación alrededor de estas geometrías. En general, los dispositivos de inyección de tipo pluma comprenden tres elementos principales: una sección de cartucho que incluye un cartucho que suele estar contenido dentro de una carcasa o soporte; un conjunto de aguja conectado a un extremo de la sección del cartucho; y una sección de dosificación conectada al otro extremo de la sección del cartucho. El cartucho, a menudo también denominado "ampolla", normalmente incluye un depósito que se llena con un medicamento, un tapón o cubierta de tipo caucho móvil ubicado en un extremo del depósito del cartucho, y una parte superior que tiene un sello de caucho perforable ubicado en el otro extremo, que presenta frecuentemente un estrechamiento. Por lo general, se usa una banda de metal anular ondulada para mantener el sello de caucho en su lugar. Si bien la carcasa del cartucho suele estar fabricada de plástico, históricamente los depósitos de los cartuchos se han fabricado de vidrio.

60 La administración de las unidades de administración puede tener lugar una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día, seis veces al día, siete veces al día u ocho veces al día. Cualquier otra administración diaria de la unidad de administración también está abarcada por la presente invención.

La composición de la presente invención es adecuada para su uso en medicina, particularmente para su uso en medicina humana. Particularmente, la composición es para inyección, por ejemplo, para inyección subcutánea, intramuscular, pulmonal, nasal, intratecal o intravenosa. En una forma de realización, la composición es para inyección subcutánea y/o intravenosa, en otra forma de realización para inyección subcutánea.

Las referencias a los procedimientos de tratamiento por terapia en la presente descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la invención para su uso en esos procedimientos.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar un trastorno que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición tal como se ha descrito anteriormente a un paciente que lo necesite. En particular, el paciente es un paciente humano. El trastorno puede ser diabetes mellitus, tal como diabetes mellitus de tipo I o II, y/u obesidad.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente del principio activo (también denominado en el presente documento principio activo farmacéutico (API)), o de los principios activos, para proporcionar el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un péptido de SEQ ID NO.: 2 es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/dosis, particularmente de aproximadamente 0,1 mg/dosis a aproximadamente 10 mg/dosis. De acuerdo con la presente invención, el péptido de SEQ ID NO.: 2 puede administrarse solo, es decir, el péptido se administra como tal o, preferentemente, en una formulación en la que es el único principio activo farmacéutico.

La composición de acuerdo con la presente invención se pretende particularmente para tratar la diabetes mellitus y/u obesidad, más particularmente para tratar la diabetes mellitus de tipo I o II y/o para tratar la obesidad. En determinadas formas de realización, la composición es para su uso en un procedimiento para tratar la diabetes mellitus, particularmente la diabetes mellitus de tipo II, y/o para uso en un procedimiento para tratar la obesidad. La composición de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para controlar la concentración de glucosa en plasma en ayunas, posprandial o/y posabsortivo, para mejorar la tolerancia a la glucosa, para prevenir la hipoglucemia, para prevenir la pérdida funcional de las células β del páncreas, para efectuar la pérdida de peso, o/y para prevenir el aumento de peso. Otras posibles indicaciones son obesidad y obesidad en presencia de al menos una afección comórbida relacionada con el peso, por ejemplo, hipertensión, diabetes mellitus de tipo II y/o dislipidemia.

La presente invención proporciona además una composición de acuerdo con la presente invención para su uso en un procedimiento para tratar la diabetes mellitus y/o la obesidad, más particularmente la diabetes mellitus de tipo I o II y/o la obesidad. Los pacientes tratados pueden tener un valor de HbA1c en el intervalo de 7% a 10%.

La presente invención proporciona además un procedimiento para fabricar una composición de acuerdo con la presente invención, que comprende formular un péptido de SEQ ID NO.: 2 o/y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con cloruro de sodio y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención prevé además el uso de la composición de acuerdo con la invención en pacientes con diabetes mellitus de tipo II como complemento de una dieta con el fin de mejorar el control del azúcar en sangre con una inyección una vez al día (por ejemplo, reduce sustancialmente y de forma sostenible (> 2 años) glucosa (Δ HbA1c > -1,0%) y peso (> -10%).

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: La pureza de las formulaciones concentradas de 0,5 y 5 mg/ml depende del pH a 40 °C y es más alta al pH más bajo analizado.

Figura 2: El contenido de HMWP de las formulaciones concentradas de 0,5 y 5 mg/ml depende del pH a 40 °C.

Figura 3: La pureza de las formulaciones concentradas de 0,5 y 5 mg/ml depende del tipo de ajustador de la tonicidad y estabilizador a 40 °C.

Figura 4: El contenido de HMWP de las formulaciones concentradas de 0,5 y 5 mg/ml depende del tipo de ajustador de la tonicidad y estabilizador a 40 °C.

Figura 5: Energía de unión de muestras de estabilidad de las formulaciones que contienen cloruro de sodio.

Figura 6: Ensayo comparativo de liraglutida y SEQ ID NO.: 2, a) SEQ ID NO.: 2, +37 °C, 500 rpm; intervalo del eje y 0-6000 RFU (unidades de fluorescencia relativas); b) liraglutida, +37°C, 500 rpm; intervalo del eje y 0-6000 RFU; c) SEQ ID NO.: 2, +37 °C, 500 rpm; intervalo del eje y 0-200 RFU.

Figura 7: Evaluación reológica de la formulación con un reómetro capilar.

EJEMPLOS

5 Las abreviaturas empleadas son las siguientes:

ACN: acetonitrilo

API: principio activo farmacéutico

10 DLS: dispersión de luz dinámica

FTIR: espectroscopía infrarroja por transformación de Fourier

15 GCG: glucagón

GLP-1: péptido similar al glucagón 1

HMWP: proteína de alto peso molecular

20 HPLC cromatografía líquida de alto rendimiento

HPSEC cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento

25 LLPS: separación de fases líquido-líquido

PEG: polietilenglicol

HR: humedad relativa

30 TFA: ácido trifluoroacético

Tht: Tioflavina T

35 Ejemplo 1: Evaluación de la estabilidad química

La detección y la cuantificación de impurezas y productos de degradación se llevan a cabo mediante cromatografía líquida en fase inversa (HPLC) utilizando un procedimiento de gradiente con detección UV. En HPLC, las impurezas se calcularon utilizando el procedimiento del porcentaje de área del pico, y el contenido de API se calculó mediante normalización externa.

40 Columna: acero inoxidable, 150 mm x 4,6 mm de diámetro interno (XSelect CSH C18, 2,5 µm, Waters).

Fase móvil: agua/acetonitrilo/ácido trifluoroacético.

45 Caudal: 1,0 ml/min.

Temperatura: +45 °C

50 Longitud de onda de detección: UV a 210 nm

Solución de ensayo: 0,5 mg/ml de muestra de ensayo (sin diluir para 0,5 mg/formulación, diluida con acetonitrilo/agua para 5,0 mg/ml de formulación).

55 La cantidad de proteínas de alto peso molecular se determina utilizando cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC). En HPSEC, las HMWP se calcularon utilizando el procedimiento del porcentaje de área del pico.

Columna: acero inoxidable, 300 mm x 7,8 mm de diámetro interno (Columna Insulin HMWP de Waters, o equivalente).

60 Fase móvil: tampón de arginina/acetonitrilo/ácido acético.

Caudal: 0,45 ml/min.

65 Temperatura: Temperatura ambiente

Longitud de onda de detección: UV a 283 nm

Solución de ensayo: 0,5 mg/ml de muestra de ensayo (sin diluir para 0,5 mg/formulación, diluido con acetonitrilo/agua para 5,0 mg/ml de formulación).

Se inició un estudio con 20 ejecuciones de un estudio de diseño experimental (DoE) para determinar el tipo óptimo del ajustador de la tonicidad y/o estabilizador y para verificar el pH que garantiza la mayor estabilidad química del péptido SEQ ID NO.: 2 como principio activo farmacéutico (API). El estudio de estabilidad se inició a 5 °C, 25 °C y a 40 °C con condiciones de almacenamiento de 2 y 4 semanas.

En el diseño estadístico, el efecto de la concentración del API se analizó a 2 niveles, el efecto del pH a tres niveles, el efecto de conservantes a tres niveles, el efecto de los ajustadores de la tonicidad a tres niveles y el efecto de los aditivos a dos niveles. La tabla 1a, a continuación, muestra un resumen de los factores controlados, y la tabla 1b muestra detalles de las 20 ejecuciones.

El diseño propuesto es un diseño de superficie de respuesta óptima IV que permite estudiar los efectos principales y las interacciones de nivel 2 con API en un mínimo de experimentos. Los resultados al principio y después de 14 y 28 días de almacenamiento se combinan para el análisis para permitir la estimación del efecto lineal y cuadrático del factor tiempo y las interacciones correspondientes de nivel 2.

Los datos para las diferentes condiciones de almacenamiento se analizan independientemente. Se realiza una selección hacia atrás para mantener en el modelo solo los términos que tienen un efecto significativo al 10%.

El procedimiento Box-Cox también se usa para aplicar una transformación de datos si es necesario. El "procedimiento Box-Cox" se refiere a un ensayo sistemático de posibles transformaciones para garantizar la distribución normal de los datos y una baja variabilidad alrededor del modelo (por ejemplo, para una regresión lineal, todas las mediciones individuales se encuentran lo más cerca posible de la línea de regresión). Después del análisis de cada parámetro, se realiza una función de deseabilidad, utilizando los pesos relativos definidos por el científico, para obtener un óptimo global.

Tabla 1a Lista de factores controlados

Factor (unidad)	Descripción	Dominio experimental
Concentración de API (cuantitativo, mg/ml)		2 niveles fijos: 0,5 mg/ml, 5 mg/ml
pH (cuantitativo, NA)		3 niveles fijos: 6,5, 7,0, 7,4
Conservantes (cualitativo, NA)	Fenol: 6 mg/g, m-cresol: 3 mg/g	3 modalidades: m-cresol, fenol, m-cresol+fenol
Ajustadores de la tonicidad (cualitativo, NA)	Glicerol al 85%: 5,0 mg/g, manitol: 8,7 mg/g, NaCl: 1,7 mg/g	3 modalidades: glicerol, manitol, NaCl
Disolvente (cualitativo, NA)	Propilenglicol: 7,5 mg/g	2 modalidades: propilenglicol, ninguna
NA: no aplicable		

Tabla 1b: Diseño propuesto con 20 ejecuciones

Ejecución*	Concentración de API (mg/ml)	pH	Conservantes	Ajustadores de la tonicidad	Aditivos
1	5	6,5	fenol	manitol	ninguno
2	0,5	7,0	m-cresol	NaCl	propilenglicol
3	5	7,0	m-cresol+fenol	manitol	ninguno
4	5	7,4	fenol	NaCl	ninguno
5	0,5	6,5	m-cresol	glicerol	ninguno
6	5	7,4	m-cresol+fenol	glicerol	ninguno
7	0,5	7,4	m-cresol+fenol	NaCl	ninguno
8	5	6,5	m-cresol+fenol	NaCl	propilenglicol

Ejecución*	Concentración de API (mg/ml)	pH	Conservantes	Ajustadores de la tonicidad	Aditivos
9	0,5	6,5	m-cresol+fenol	manitol	propilenglicol
10	5	7,4	m-cresol	manitol	propilenglicol
11	0,5	7,4	fenol	glicerol	propilenglicol
12	5	7,0	fenol	glicerol	propilenglicol
13	5	6,5	m-cresol	glicerol	ninguno
14	0,5	7,0	m-cresol+fenol	glicerol	propilenglicol
15	0,5	7,0	fenol	manitol	ninguno
16	5	7,0	m-cresol	NaCl	ninguno
17	0,5	6,5	fenol	NaCl	propilenglicol
18	0,5	7,4	m-cresol	manitol	propilenglicol
19	0,5	7,0	m-cresol	NaCl	propilenglicol
20	5	7,0	m-cresol+fenol	manitol	ninguno

*Las ejecuciones 4, 6-7, 10-11 y 18 no son formas de realización de la presente invención, sino que están configuradas con fines de comparación.

La pureza del principio activo (API; SEQ ID NO.:2) y el contenido de proteína de alto peso molecular (HMWP) en las formulaciones de ensayo dependen del valor de pH, tal como se puede observar en los resultados presentados en las figuras 1 y 2.

5 La figura 1 es un gráfico de interacción que muestra diferencias en la pureza entre diferentes valores de pH para una baja concentración de API. El círculo es el punto de diseño; eje X1 = concentración de API; eje X2 = pH; factores concretos: conservante = fenol; ajustador de la tonicidad = NaCl; disolvente = propilenglicol; tiempo = 14 d.

10 La figura 2 es un gráfico de interacción que muestra diferencias en HMWP dependiendo del pH para una concentración de API baja. El círculo es el punto de diseño; eje X1 = concentración de API; eje X2 = pH; factores concretos: conservante = fenol; ajustador de la tonicidad = NaCl; disolvente = propilenglicol; tiempo = 14 d.

15 La pureza más alta y el contenido más bajo de HMWP se encontraron a pH 6,5/6,6.

La pureza y el contenido de proteína de alto peso molecular (HMWP) de las formulaciones de ensayo dependen además del tipo del ajustador de la tonicidad y estabilizador tal como se muestra en las figuras 3 y 4. Las formulaciones elaboradas con NaCl como ajustador de la tonicidad tienen una estabilidad significativamente mayor, una pureza más alta y una formación de HMWP más baja que las formulaciones elaboradas con otro tipo de ajustadores de la tonicidad, tales como manitol y glicerol.

20 La figura 3 es un gráfico de efectos principales que muestra una disminución inferior en la pureza cuando se usa cloruro de sodio como ajustador de la tonicidad, en comparación con manitol y glicerol. Los círculos en la figura son los puntos de diseño, las líneas discontinuas las bandas de CI; eje X1 = tiempo; eje X2 = tonicidad; factores concretos: Concentración de API = 0,5 mg/ml; pH = 6,5; conservante = fenol; disolvente = propilenglicol.

25 La figura 4 es un gráfico de interacción que muestra las diferencias entre isotonzadores con respecto a HMWP a lo largo del tiempo. Los círculos en la figura son los puntos de diseño, las líneas discontinuas las bandas CI; eje X1 = tiempo; eje X2 = tonicidad; factores concretos: Concentración de API = 0,5 mg/ml; pH = 6,5; conservante = fenol; disolvente = propilenglicol.

30 Se encontró la pureza más alta y el contenido más bajo de HMWP para las composiciones que contienen NaCl como ajustador de la tonicidad y estabilizador.

35 Como se puede observar en la figura 1-4, los efectos más fuertes, además del tiempo y sus interacciones, son la concentración de API, el pH y la tonicidad.

Para resumir los datos representados en las figuras 1-4, se obtiene la pureza más alta para una concentración de API alta, pH bajo y NaCl como un ajustador de la tonicidad.

40 **Ejemplo 2: Evaluación de la estabilidad física**

A) Estabilidad coloidal

El propósito del estudio fue evaluar la estabilidad coloidal de la formulación que contiene un ajustador de la tonicidad iónico y estabilizador con el procedimiento de separación de fases líquido-líquido (LLPS). La estabilidad coloidal, que es una medida de interacción de moléculas coloidales en la solución, se puede expresar en términos de energía de unión. La separación de fases líquido-líquido está provocada por la atracción neta entre las moléculas coloidales (por ejemplo, proteínas, péptidos), y mide así la interacción de moléculas en la solución en términos de energía de unión. La separación de fases líquido-líquido inducida por polietilenglicol (PEG) es una forma cuantitativa rápida de estimar la interacción atractiva intermolecular neta de la solución coloidal (anticuerpos o péptido) y se puede utilizar para obtener información sobre la propensión de un candidato o formulaciones a formar agregados.

La energía de unión es indicativa de estabilidad coloidal se calculó usando la ecuación de Wang et al. (Mol. Pharm. 11(5), 1391-1402, 2014):

$$\ln\left(\frac{v_0 N_A}{M_1} C_1^1\right) = -\frac{\epsilon_B}{kT} - \Delta v \frac{\Pi_2}{kT}$$

con

N_A = número de Avogadro

M_1 = peso molecular de la molécula

C_1^1 = concentración de masa de molécula en el sobrenadante

k = Constante de Boltzmann

T = Temperatura absoluta

v_0 = volumen por molécula en la fase condensada

Π = presión osmótica de PEG

Δv = zona de agotamiento por proteína en la fase condensada líquida

Para evaluar la estabilidad coloidal de una solución inyectable que comprende el péptido SEQ ID NO.: 2 como principio activo a 5,0 mg/ml y 10,0 mg/ml, se realizó un estudio LLPS inducido por PEG en muestras de estabilidad de nueve y dieciocho meses.

La preparación de la solución de polietilenglicol se llevó a cabo de la forma siguiente. La solución al 40% (p/v) de polietilenglicol se disolvió en solución de placebo. El pH de la solución se ajustó a 6,6 utilizando hidróxido de sodio 1 N. La solución de PEG se almacenó a +2 °C - +8 °C durante 3 días y se comprobó nuevamente el pH para determinar la deriva del pH.

Una mezcla de una muestra que contiene API (SEQ ID NO.: 2) (5,0 mg/ml o 10,0 mg/ml de API, tampón fosfato de sodio, m-cresol, cloruro de sodio, pH ≈6,6; para más detalles, véase la tabla 2, a continuación) y la solución de PEG se incubó a +5 °C durante 2 días. Después de la incubación, la mezcla de muestra-PEG se centrifugó durante dos minutos a 16900 G a +5 °C. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se transfirieron para el análisis de RP-HPLC para mediciones de concentración de péptidos en equilibrio, se aplicó el mismo procedimiento de HPLC tal como se explica en el ejemplo 1.

La energía de unión de las tres muestras de estabilidad fue negativa, lo que sugiere que las interacciones interpeptídicas entre las moléculas peptídicas son altamente repulsivas (figura 5). La energía de unión del péptido a 5 mg/ml, la estabilidad a 5 °C durante 9 y 18 meses y la energía de unión del péptido a 10 mg/ml, la estabilidad a 5 °C durante 9 meses no fue significativamente diferente. Los datos de energía de unión del péptido a 5 mg/ml de formulación concentrada incubada a 5 °C durante 9 y 18 meses sugieren que la estabilidad coloidal del péptido a una concentración de 5 mg/ml no cambia tras la incubación prolongada a 5 °C. La comparación de muestras de 5 mg/ml y 10 mg/ml incubadas a 5 °C durante 9 meses sugiere que el péptido en ambas concentraciones es igualmente estable.

b) Dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS)

La dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) revela estructuras de solución de macromoléculas biológicas y nanopartículas sintéticas a una resolución de 1-2 nm.

Las mediciones de SAXS se realizaron en una fuente de luz de sincrotrón (DESY Hamburg). Los datos de dispersión de todas las muestras se recogieron cargando 20 microlitros de soluciones en el capilar y haciendo fluir todo el volumen a través del haz de rayos X. Por cada muestra se recogieron 20 cuadros de exposición de 0,045 s y, después de una comprobación de consistencia estadística, se realizó un promedio. A continuación, se restaron las señales correspondientes recogidas para el placebo. Cada medición de muestra se repitió al menos dos veces para garantizar la reproducibilidad.

El mejor ajuste entre la curva de dispersión de rayos X de ángulo pequeño observada experimentalmente y la calculada se obtiene usando un modelo en el que la SEQ ID NO.: 2 es totalmente hexamérica en las formulaciones. Totalmente hexamérica significa que todas las moléculas peptídicas están dispuestas en oligómeros físicos que contienen 6 moléculas de SEQ ID NO.: 2.

c) Dispersión de luz dinámica (DLS)

La intensidad de dispersión de la luz de las partículas es proporcional al diámetro y, por lo tanto, extremadamente sensible a la agregación. Para el análisis de péptidos de incretina, se utiliza DLS como procedimiento estándar para medir la agregación. Si se detectan partículas de alto peso molecular, esto puede ser debido al hecho de que el tampón no se ha filtrado suficientemente. Por otra parte, si no se mide una intensidad de peso molecular alta, esto significa que no había agregados presentes en la muestra.

Los experimentos DLS se realizaron con un aparato Malvern Zetasizer Nano ZS. La formulación se pipeteó en la celda de medición, la temperatura se equilibró a +25 °C y se midió en modo NIBS (Retrodispersión no invasiva).

La dispersión dinámica de la luz se realizó con una composición de la invención (0,5 mg/ml y 5,0 mg/ml, respectivamente, tampón de fosfato, NaCl y m-cresol, pH de aproximadamente 6,6; para más detalles, véase la tabla 2, a continuación) para supervisar el diámetro hidrodinámico. Para ambas concentraciones de API, se encontró un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 6 nanómetros. El valor de 6 nM indica que el API está presente en forma de hexámero (véase arriba). Estos resultados respaldan además la ausencia de agregados más grandes no deseados, para los que se habrían medido diámetros hidrodinámicos más grandes (tales como 100 nm). Estos resultados están en línea con los resultados de SAXS.

Ejemplo 3: Tendencia a la fibrilación

Se realizaron investigaciones para determinar las tendencias de fibrilación en condiciones de tensión usando un ensayo de ThT. El ThT es un colorante que, después de unirse a estructuras ricas en láminas beta, muestra una fluorescencia mejorada y un cambio al rojo característico del espectro de emisión. Las estructuras similares a amiloides muestran una estructura rica en láminas beta. La fibrilación de soluciones peptídicas está inducida por tensiones térmicas y mecánicas. Las muestras se someten a tensión en condiciones definidas usando Fluoroskan Ascent FL.

Para los ensayos en Fluoroskan Ascent, se dispusieron 200 µl de muestra en placa de microtitulación PS de 96 pocillos, fondo plano, Greiner Fluotrac N° 655076. Las placas se sellaron con cinta Scotch (Quiagen). Las muestras se sometieron a tensión mediante ciclos continuos de agitación de 10 s a 960 rpm y periodo de descanso de 50 s a +37 °C. La cinética se supervisó midiendo la intensidad de fluorescencia cada 20 minutos.

Las soluciones se transfirieron en viales Eppendorf de 2 ml y se añadieron 20 µl de una solución 10,1 mM de ThT en H₂O a 2 ml de solución peptídica para obtener una concentración final 100 µM de ThT. Para cada muestra se analizaron ocho réplicas.

Se descubrió que el péptido de SEQ ID NO.: 2 (a una concentración de 1 mg/ml en PBS) es más resistente a tensiones mecánicas y térmicas que la liraglutida (SEQ ID NO.: 1; 1 mg/ml en PBS), véase la figura 6. La figura ilustra que el péptido de SEQ ID NO.:2, a diferencia de la liraglutida, muestra una fibrilación insignificante incluso después de 100 h de incubación a +37 °C y 500 rpm. En un experimento adicional, no se observó fibrilación después de 100 horas a una agitación a 37 °C (500 rpm) en una solución que contenía 5 mg/ml de SEQ ID NO.:2, tampón de fosfato, NaCl y m-cresol, pH≈6,6; véase la tabla 2, a continuación).

Ejemplo 4: Evaluación química y biofísica

El propósito del estudio fue evaluar la estabilidad química y biofísica de formulaciones que contenían SEQ ID NO.: 2 con diferentes relaciones de péptidos y sal natural, que son 0,08 (0,5 mg : 6,30 mg) para la formulación concentrada de 0,5 mg/ml, 0,8 (5 mg : 6,30 mg) para la formulación concentrada de 5,0 mg/ml y 0,24 (1,5 mg : 6,30 mg) para la formulación concentrada de 1,5 mg/ml.

Se analizó la composición siguiente:

Tabla 2 - Composición analizada

Sustancia	Especificación farmacopea según	Cantidad por unidad
Péptido de SEQ ID NO.: 2	Sanofi-Aventis	0,50 mg (lote A) o 5,0 mg (lote B) o 1,5 mg (lote C)
Dihidrogenofosfato de sodio dihidrato	Ph. Eur./USP	3,03 mg
Hidrogenofosfato de disodio dodecahidrato	Ph. Eur./USP	3,77 mg
m-Cresol	Ph. Eur./USP	3,15 mg
Cloruro de sodio	Ph. Eur./USP	6,30 mg
Ácido clorhídrico 0,1 N	Ph. Eur./USP	hasta pH 6,6
Solución de NaOH 0,1 N	Ph. Eur./USP	hasta pH 6,6
Agua para inyección (Wfi)	Ph. Eur./USP	hasta 1,0 ml

Las formulaciones se almacenan en unidades que están destinadas a estudios clínicos y a ventas y distribución.

En la tabla siguiente se resumen tiempos de almacenamiento, condiciones de almacenamiento, puntos temporales.

Tabla 3 - Resumen de condiciones

Condición	Intervalo de ensayo (meses)			
	0	1	3	6
Almacenamiento a largo plazo				
+5 ± 3°C	x	x	x	x
Condiciones aceleradas (temperatura, humedad)				
+25 ± 2 °C/60 ± 5% de HR	x	x	x	x
+37 ± 2 °C/75 ± 5% de HR	x	x	-	-

La orientación de almacenamiento de formulaciones se invirtió. HR significa humedad relativa. El punto temporal 0 es el inicio del almacenamiento. Las mediciones en el punto temporal 0 se utilizan como referencia para todas las condiciones analizadas.

La estabilidad física y química de las formulaciones almacenadas se determina con la ayuda de los ensayos siguientes:

- Se aplicó el procedimiento de dispersión de luz dinámica (DLS) para acceder a la distribución del tamaño de partícula subvisible
- Espectroscopia infrarroja por transformación de Fourier (FTIR) para analizar la relación de láminas alfa y beta
- Estabilidad química (pureza e impurezas), determinada por HPLC
- Proteínas de alto peso molecular, determinadas por HPSEC

Todos los valores se determinaron mediante HPLC con el denominado procedimiento del 100%. En este caso, en particular, implica HPLC en fase inversa (columna C 18), en la que se utilizó un procedimiento de gradiente para la fase móvil:

a) 0,1% de TFA, 15% de ACN y b) 0,1% de TFA, 75% de ACN.

Detección a 210 nm (UV).

Las proteínas de alto peso molecular (HMWP) se detectaron mediante HPSEC, descrita en la Farmacopea Europea 6.0 para preparaciones de insulina inyectables.

Los valores porcentuales son los valores de contenido (valores porcentuales de impurezas) de impurezas totales y de proteínas de alto peso molecular (HMWP).

Resultados

Las formulaciones se estudiaron por separado para lotes paralelos A (0,5 mg/ml de API), B (5,0 mg/ml de API) y C (1,5 mg/ml) con respecto a los siguientes parámetros:

Estabilidad biofísica con la evaluación de los resultados de DLS y FTIR. No se observó inestabilidad física incluso para una formulación que contenía cloruro de sodio a alta concentración (0,5 mg/ml de péptido con una concentración de cloruro de sodio de 6,3 mg/ml). Los datos de DLS y FTIR fueron estables durante el estudio de estabilidad y no se analizó un aumento en la lámina beta.

Impurezas totales. Se observó un aumento en la suma de impurezas/productos de degradación. Este aumento no se debe a un aumento de una sola impureza, pero se observa un ligero aumento de aproximadamente el 0,1 al 0,2% para diversas impurezas. Los resultados de estabilidad respaldan la vida útil mínima de 24 meses del fármaco independientemente de la concentración del principio activo farmacéutico dentro de la formulación.

Proteínas de alto peso molecular (HMWP). Solo hay un ligero aumento en las proteínas de alto peso molecular observado a 5 °C y 25 °C. A 37 °C después de 1 mes de almacenamiento, el aumento se encuentra entre el 0,3 y el 0,7% y los resultados se encuentran dentro de la especificación $\leq 2,0\%$.

Los datos se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 4: Resumen de resultados

Lote A: 0,5 mg/ml								
+5 °C	t ₀	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Ensayo de SEQ ID NO.: 2 en mg/ml	0,50	0,50	0,49	0,50	0,50	0,51	0,51	0,50
Impurezas totales en %	3,1	3,1	3,7	3,9	4,3	4,7	4,9	6,0
Proteínas de alto peso molecular en %	0,4	0,5	0,5	0,5	0,7	0,9	1,0	1,0
FTIR: láminas alfa / beta en %	50,3/ 16,7	-	-	47,5/ 17,5	-	53,2/ 22,6	48,1/ 11,7	50,2/ 12,8
DLS en ml	-	-	-	-	-	-	-	-
+25 °C	t ₀	1 mes	3 meses	6 meses				
Ensayo de actividad en mg/ml	0,50	0,49	0,47	0,46				
Impurezas totales en %	3,1	4,1	7,1	10,0				
Proteínas de alto peso molecular en %	0,4	0,7	0,9	1,5				
FTIR: láminas alfa / beta en %	50,3/ 16,7	-	-	46,7/ 20,8				
DLS en ml	-	-	-	-				
+37 °C	t ₀	1 mes	3 meses	6 meses				
Ensayo de SEQ ID NO.: 2 en mg/ml	0,50	0,46	-	-				
Impurezas totales en %	3,1	8,1	-	-				
Proteínas de alto peso molecular en %	0,4	1,1	-	-				
FTIR: láminas alfa / beta en %	50,3/ 16,7	-	-	-				
DLS en ml	-	-	-	-				

ES 3 027 617 T3

Lote B: 5,0 mg/ml								
+5 °C	t ₀	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Ensayo de SEQ ID NO.: 2 en mg/ml	5,13	5,20	5,08	4,96	5,12	5,26	5,25	5,18
Impurezas totales en %	3,1	3,2	3,9	3,8	4,2	4,7	4,9	6,0
Proteínas de alto peso molecular en %	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,6	0,6	0,7
FTIR: láminas alfa / beta en %	46,9/ 13,9	-	-	48,0/ 15,5	-	52,0/ 12,3	47,6/ 12,8	49,5/ 13,9
DLS en ml	5,93	-	-	6,15	-	-	6,02	5,60
+25 °C	t ₀	1 mes	3 meses	6 meses				
Ensayo de actividad en mg/ml	5,13	5,06	4,78	4,56				
Impurezas totales en %	3,1	4,3	7,5	9,9				
Proteínas de alto peso molecular en %	0,4	0,4	0,5	0,7				
FTIR: láminas alfa / beta en %	46,9/ 13,9	-	-	48,1/ 16,1				
DLS en ml	5,93	-	-	6,13				
+37 °C	t ₀	1 mes	3 meses	6 meses				
Ensayo de SEQ ID NO.: 2 en mg/ml	5,13	4,79	-	-				
Impurezas totales en %	3,1	8,8	-	-				
Proteínas de alto peso molecular en %	0,4	0,7	-	-				
FTIR: láminas alfa / beta en %	46,9/ 13,9	-	-	-				
DLS en ml	5,93	-	-	-				

Lote C: 1,5 mg/ml						
+5 °C	t ₀	3 meses	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Ensayo de SEQ ID NO.: 2 en mg/ml	1,47	1,46	1,39	1,43	1,43	1,39 ₅
Impurezas totales en %	3,9	4,4	5,1	5,3	6,1	6,0
Proteínas de alto peso molecular en %	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8 ₁₀
+25 °C	t ₀	3 meses	6 meses			
Ensayo de actividad en mg/ml	1,47	1,38	1,26			15
Impurezas totales en %	3,9	8,0	12,3			
Proteínas de alto peso molecular en %	0,6	1,0	1,4			20

25 **Conclusión**

Los resultados del estudio de estabilidad acelerada y a largo plazo verificaron las observaciones de los experimentos iniciales a corto plazo (almacenamiento durante 2 y 4 semanas). El cloruro de sodio garantizó la estabilidad química y biofísica adecuada del principio activo farmacéutico en la relación de péptido a sal neutra 0,08, 0,24 y 0,8.

30 **Ejemplo 5: Relación de láminas alfa y beta**

La espectroscopia FTIR es un procedimiento adecuado para la determinación de la estructura secundaria de una proteína. La vibración que da la señal más pronunciada en la espectroscopia FTIR es la vibración de estiramiento C=O de grupos amida que da como resultado una señal en la denominada región de amida I (1700-1600 cm⁻¹). Esta vibración es sensible al patrón de unión de hidrógeno, las interacciones dipolo-dipolo y la geometría del esqueleto del polipéptido. Las señales obtenidas en esta región IR proporcionan bandas típicas para los diferentes elementos estructurales secundarios de una proteína. Para la mayor parte de las proteínas, diferentes elementos estructurales secundarios influyen en el espectro IR en la región de amida I.

Como consecuencia, las bandas de componentes individuales que representan los diferentes elementos estructurales, tales como hélices α , láminas β , giros y estructuras irregulares a menudo no se resuelven y son difíciles de identificar en los amplios contornos de la banda de amida I de los espectros obtenidos experimentalmente. El programa informático OPUS incluye un procedimiento quimiométrico que analiza determinadas regiones de las bandas de amida I y amida II a partir de una biblioteca de 43 proteínas de contenido conocido de hélice α y láminas de β . Las proteínas utilizadas para la calibración del procedimiento cubrían una región del 0 al 75% para el contenido de hélice α y del 0 al 48% para el contenido de lámina β . El error promedio en hélice α predicho para las proteínas de calibración fue del 5,5%, el error en el contenido de lámina β del 4,4%, números razonables para un procedimiento empírico. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los resultados para algunas proteínas se desvían mucho más (hasta el 15%) de sus valores reales. Por lo tanto, los valores absolutos para la conformación de proteínas determinados por el procedimiento quimiométrico pueden sesgarse sistemáticamente, sin embargo, la repetibilidad de los resultados para muestras de la misma proteína se encuentra normalmente en el intervalo de +/- 2%.

Se realizaron investigaciones para determinar la relación de láminas alfa y beta a 5,0 mg/ml y 75 mg/ml de concentración, respectivamente, de la proteína biofarmacéutica (SEQ ID NO.: 2). La formulación analizada contenía un tampón de fosfato, m-cresol y cloruro de sodio (tal como se detalla en la tabla 2 anterior).

Las muestras se investigaron usando un espectrómetro infrarrojo por transformación de Fourier (FTIR) con sensor Bruker 27 equipado con una cubeta de muestreo AquaSpec con una longitud de trayectoria óptica de 7 μ m (configuración "Confocheck"). El control del espectrómetro y la evaluación de datos se realizaron mediante el paquete informático OPUS, versión 6,5. Las mediciones se realizaron tal como se describe a continuación de acuerdo con las instrucciones del fabricante:

- Comprobación diaria del sistema mediante la herramienta automatizada de "Cualificación del rendimiento" del programa informático OPUS.

- Lavado de la celda AquaSpec con agua hasta que se logre una línea de fondo limpia. En caso de que los picos residuales no puedan eliminarse purgando solo con agua, se utiliza una solución de Hellmanex al 5%.

5 • Posteriormente se miden dos muestras, en primer lugar la solución de placebo (tampón), seguida de la formulación de proteína. Se inyectan aproximadamente 50 µl en la celda mediante una jeringa Hamilton. La diferencia de los dos espectros se genera automáticamente y representa el espectro de la proteína pura. El procedimiento se repitió para cada formulación con el fin de obtener dos conjuntos de datos para el análisis duplicado.

10 • Después de la normalización, los espectros se evalúan mediante el módulo Quant2 del programa informático OPUS.

Los valores medidos de láminas alfa y beta fueron el 48,9 y el 13,1%, que se encuentran en la tendencia de los resultados de FTIR previos de formulaciones que contenían 0,5 y 5,0 mg/ml de principio activo farmacéutico.

15 **Ejemplo 6: Efecto de los tensioactivos (no es una forma de realización de la invención)**

Se elaboraron formulaciones para evaluar el efecto de tensioactivos tales como polisorbato 20, polisorbato 80 y poloxámero 188 sobre la estabilidad biofísica del principio activo farmacéutico en una formulación de solución. Las formulaciones se elaboraron a pH=7,4 con una concentración de 5,0 mg/ml de principio activo farmacéutico. Curiosamente, el tamaño de partícula medido con el procedimiento DLS (descripción general del procedimiento: véase anteriormente) aumentó para las formulaciones que contenían especialmente polisorbatos hasta 7,8 nM, fenómeno que se explicó como una formación de micelas.

25 **Ejemplo 7: Adsorción a superficies**

Se llevaron a cabo investigaciones para estudiar los fenómenos de adsorción del principio activo farmacéutico a superficies de vidrio y plástico de los recipientes primarios en una concentración peptídica de 0,05 mg/ml con una formulación que contenía una sal neutra tal como cloruro de sodio. La dilución de la formulación concentrada de 0,5 mg/ml descrita anteriormente (véase la tabla 2) se realizó con una solución que contenía NaCl al 0,9% para alcanzar la concentración de 0,05 mg/ml. La formulación diluida se almacenó en vidrio y en recipientes de plástico. Tal como se ha explicado anteriormente, la formulación contiene un tampón y un conservante microbiológico. Los resultados del ensayo mostraron la mejor recuperación en comparación con los resultados del ensayo en una concentración 10 veces mayor (0,5 mg/ml), cercana al 100%, del ensayo teórico de recipientes de vidrio.

35 La detección de los valores del ensayo al final del tiempo de adsorción se llevó a cabo mediante cromatografía líquida en fase inversa (HPLC) utilizando un procedimiento de gradiente con detección UV (véase anteriormente).

40 **Ejemplo 8: Propiedades reológicas de las formulaciones**

Se llevaron a cabo investigaciones para evaluar la propiedad fluida de la formulación para determinar si es un fluido newtoniano o no. Con este fin, una composición tal como se ha descrito anteriormente en la tabla 2 que contiene 5,0 mg/ml de SEQ ID NO.: 2 se añadió a un reómetro y se sometió a medición. Los experimentos se realizaron con un reómetro de rotación MCR (Anton Paar) y con un reómetro capilar Kinexus (Malvern). No se observaron cambios significativos en la tensión de cizallamiento o la viscosidad a velocidades de cizallamiento > 1/s* (fluido newtoniano). Las altas velocidades de cizallamiento no tienen influencia sobre la viscosidad de cizallamiento de la formulación (véase también la figura 7).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición líquida que comprende un péptido de SEQ ID NO.: 2 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo farmacéutico, cloruro de sodio y un vehículo líquido, en la que la composición comprende además un tampón farmacéuticamente aceptable, en la que la composición tiene un pH de 6,0 a 7,0.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el principio activo farmacéutico está presente en una cantidad de 1 µg/ml a 75 mg/ml, particularmente en una cantidad de 1 µg/ml a 10 mg/ml, más particularmente en una cantidad de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que el cloruro de sodio está presente en una cantidad de 0,5 mg/ml a 9 mg/ml, particularmente de 5 mg/ml a 9 mg/ml.
- 15 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la composición comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable, particularmente m-cresol.
- 20 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el tampón farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en un tampón de fosfato, particularmente un tampón de fosfato de sodio, y un tampón de citrato, particularmente un tampón de citrato de sodio.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la composición tiene un pH de 6,2 a 6,9.
- 25 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el vehículo líquido es un líquido acuoso, particularmente agua.
8. La composición de la reivindicación 7, en la que el vehículo líquido está exento de cualquier disolvente orgánico, particularmente exento de glicerol y propilenglicol.
- 30 9. La composición líquida tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que presenta actividad biológica, integridad química y/o integridad física del o de los principios activos después del almacenamiento.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que está exenta de tensioactivos, particularmente exenta de tensioactivos de polisorbato y/o poloxámeros.
- 35 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que está exenta de ajustadores de la tonicidad diferentes del cloruro de sodio, particularmente exenta de manitol.
- 40 12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que consiste en
 - (a) un péptido de SEQ ID NO: 2 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
 - (b) un tampón de fosfato de sodio de pH 6,2 a 6,9, particularmente un tampón de fosfato de sodio de aproximadamente pH 6,5 a 6,7,
 - (c) m-cresol,
 - (d) cloruro de sodio y
 - (e) agua.
- 45 13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que consiste en
 - (a) un péptido de SEQ ID NO: 2 y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad de 0,5 mg/ml a 5 mg/ml,
 - (b) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ en una cantidad de 3,03 mg/ml y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ en una cantidad de 3,77 mg/ml,
 - (c) m-cresol en una cantidad de 3,15 mg/ml,
 - (d) cloruro de sodio en una cantidad de 6,30 mg/ml,
 - (e) opcionalmente NaOH y/o HCl a pH 6,6 y
 - (f) agua, particularmente agua para inyección.
- 50 14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en medicina, particularmente para su uso en medicina humana.
- 55 15. La composición de la reivindicación 14 para su uso en un procedimiento de tratamiento de diabetes mellitus, particularmente diabetes mellitus de tipo II, y/o para su uso en un procedimiento de tratamiento de la obesidad.
- 60

Figura 1

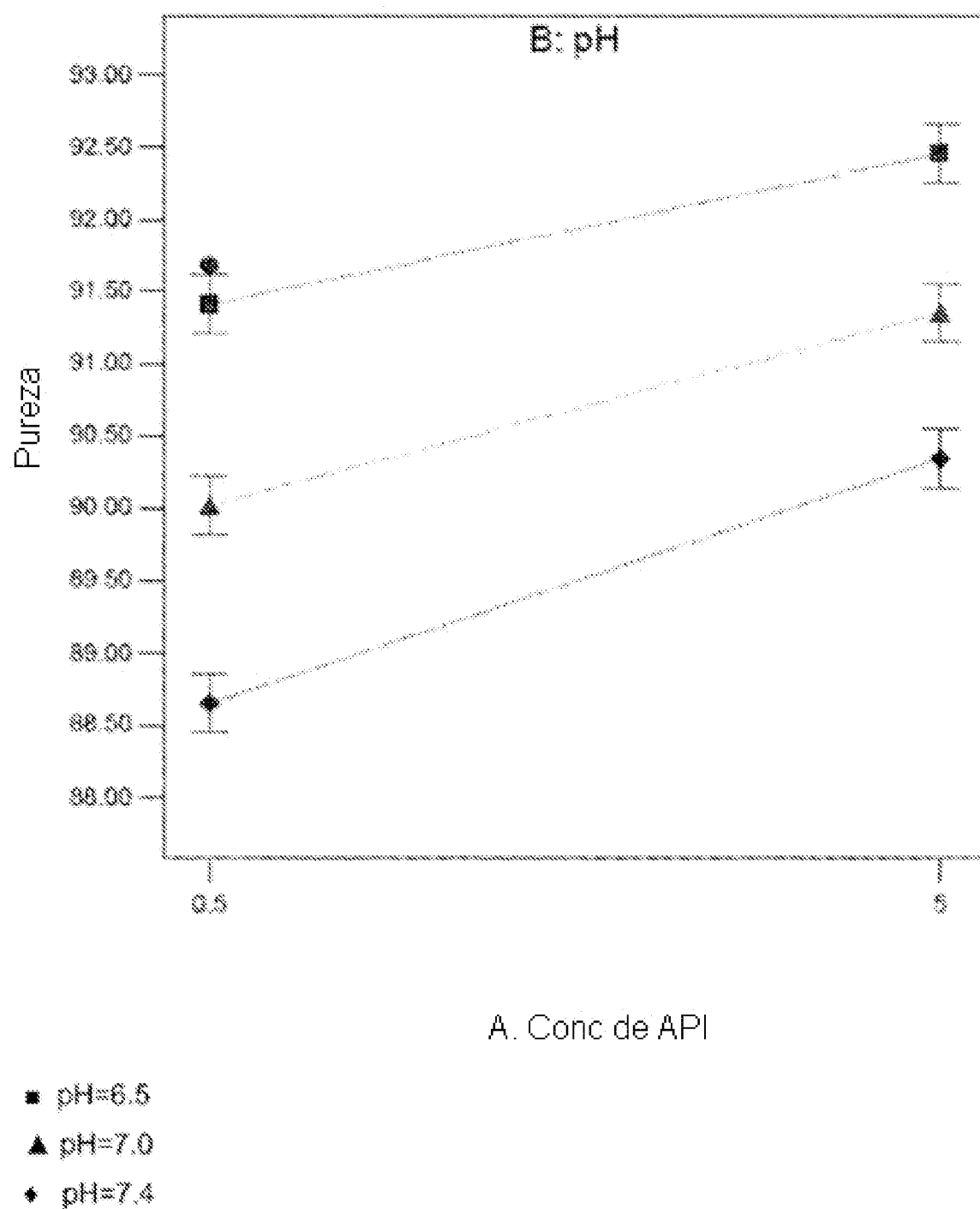


Figura 2

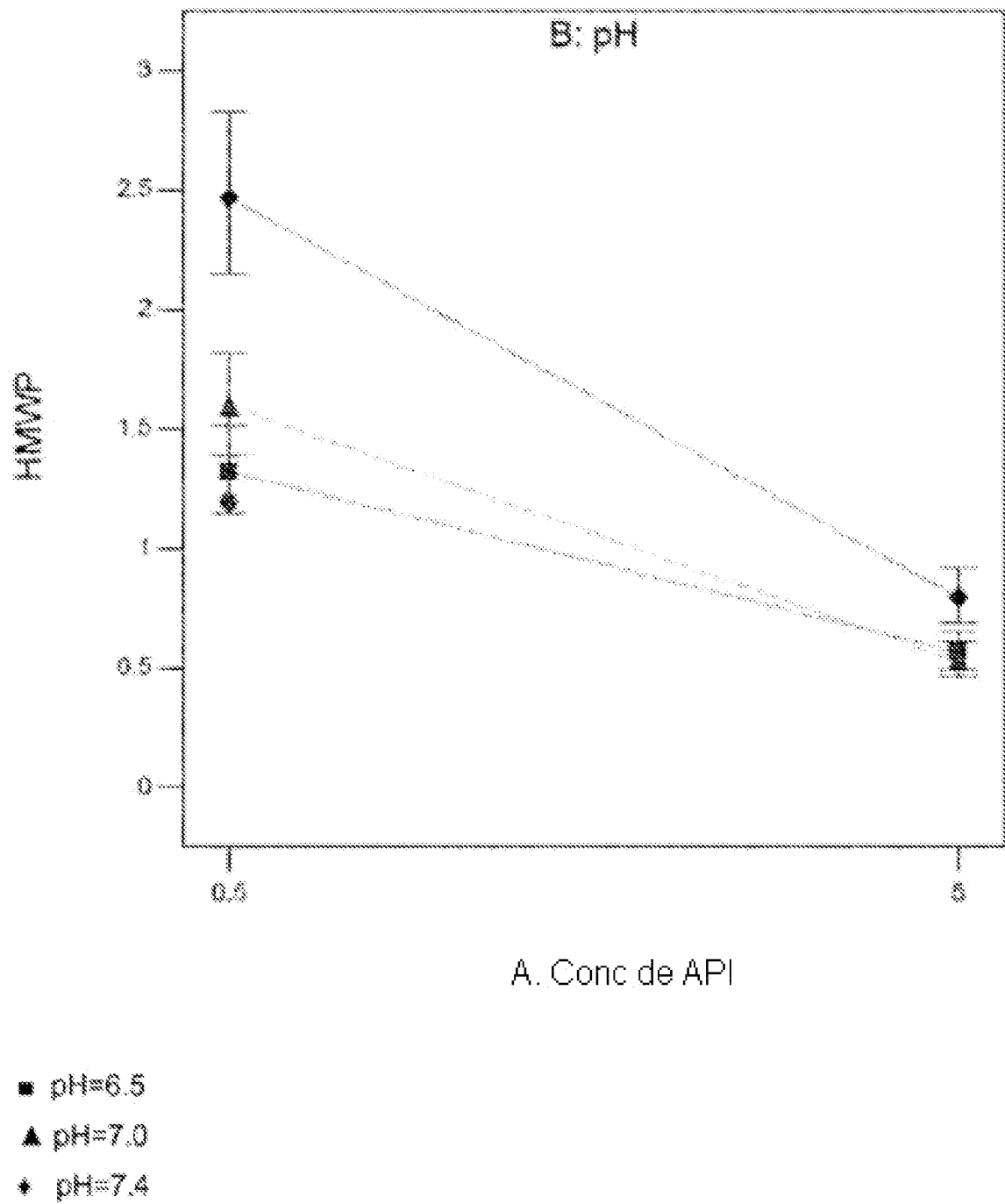


Figura 3

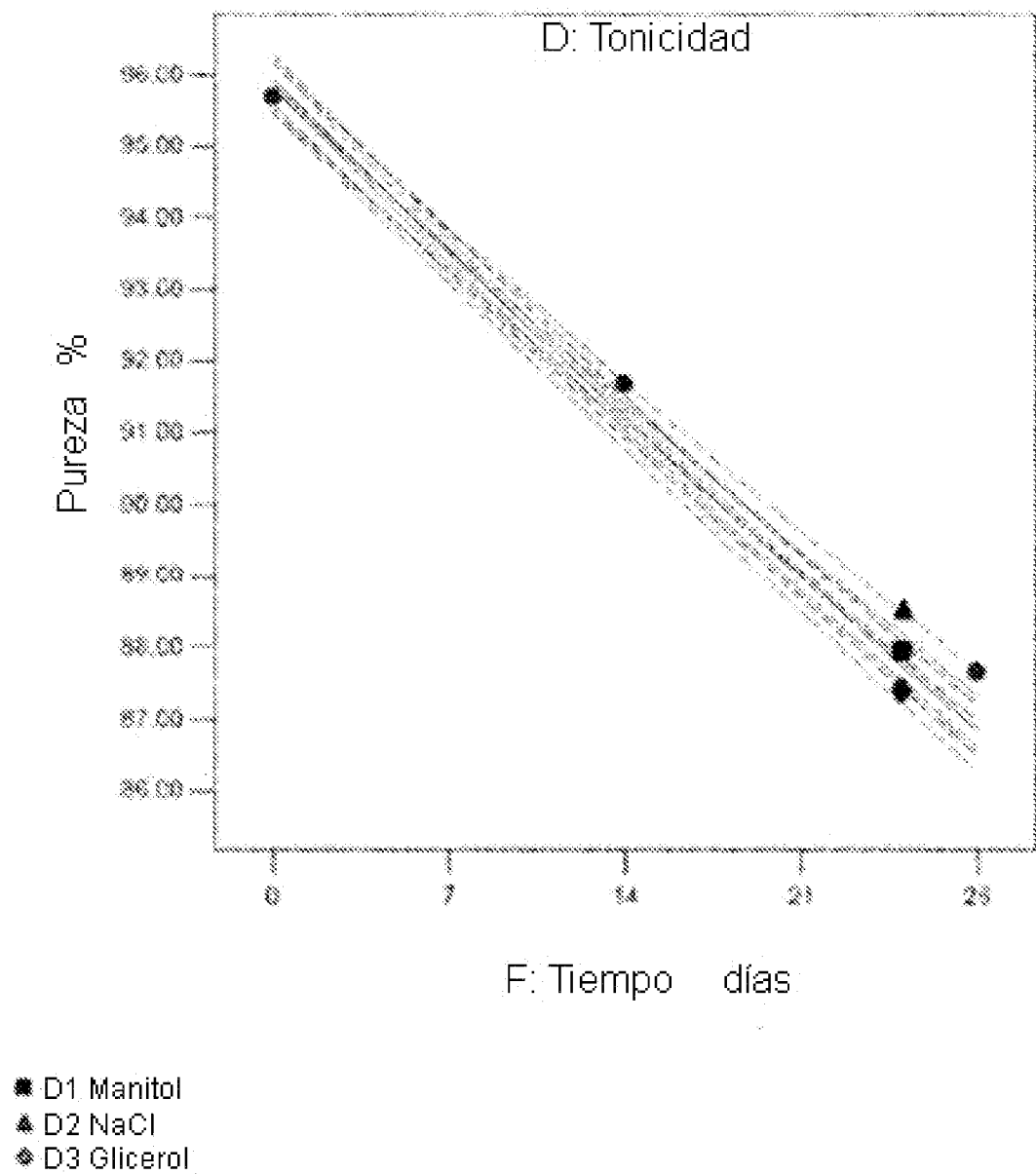


Figura 4

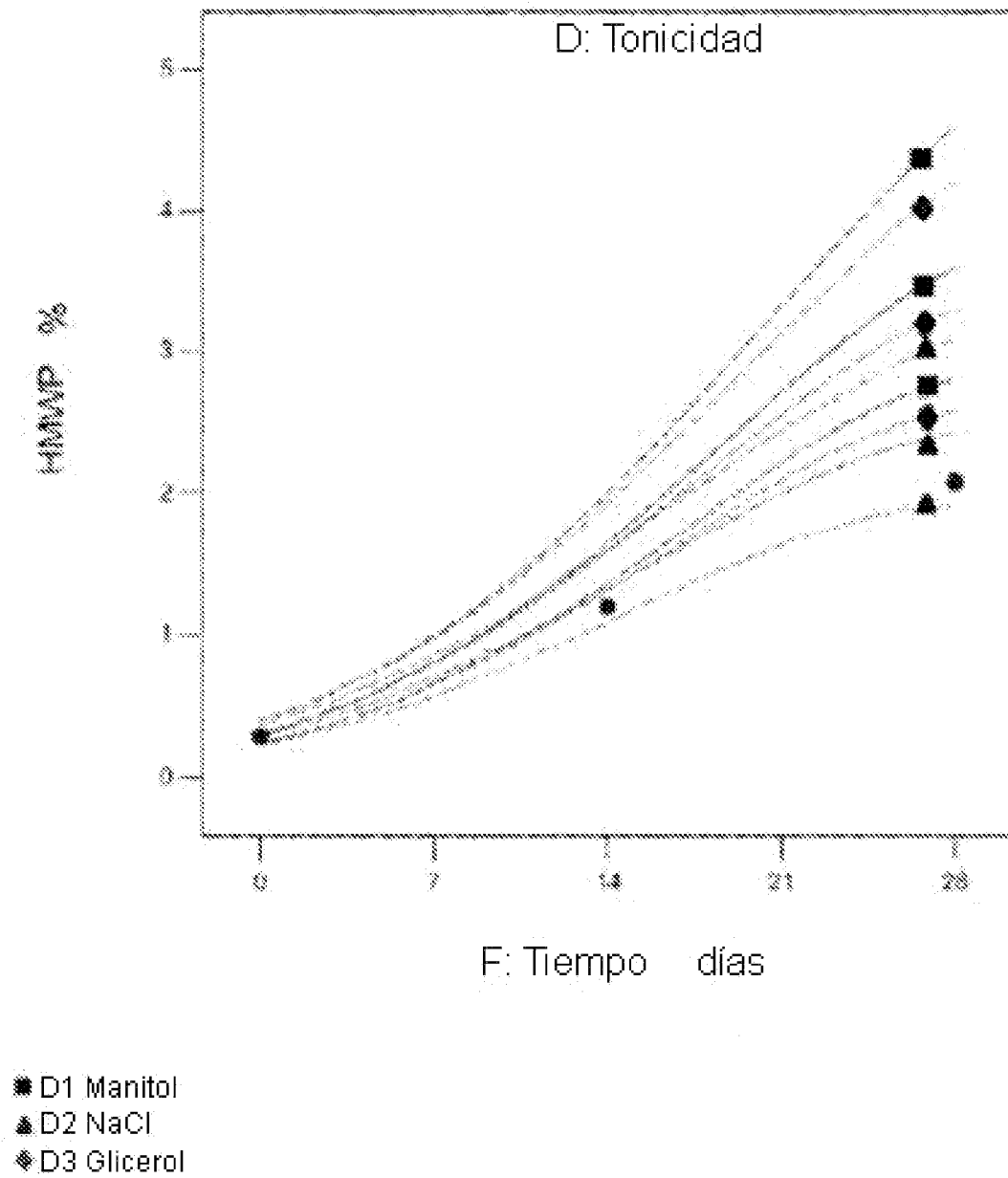


Figura 5

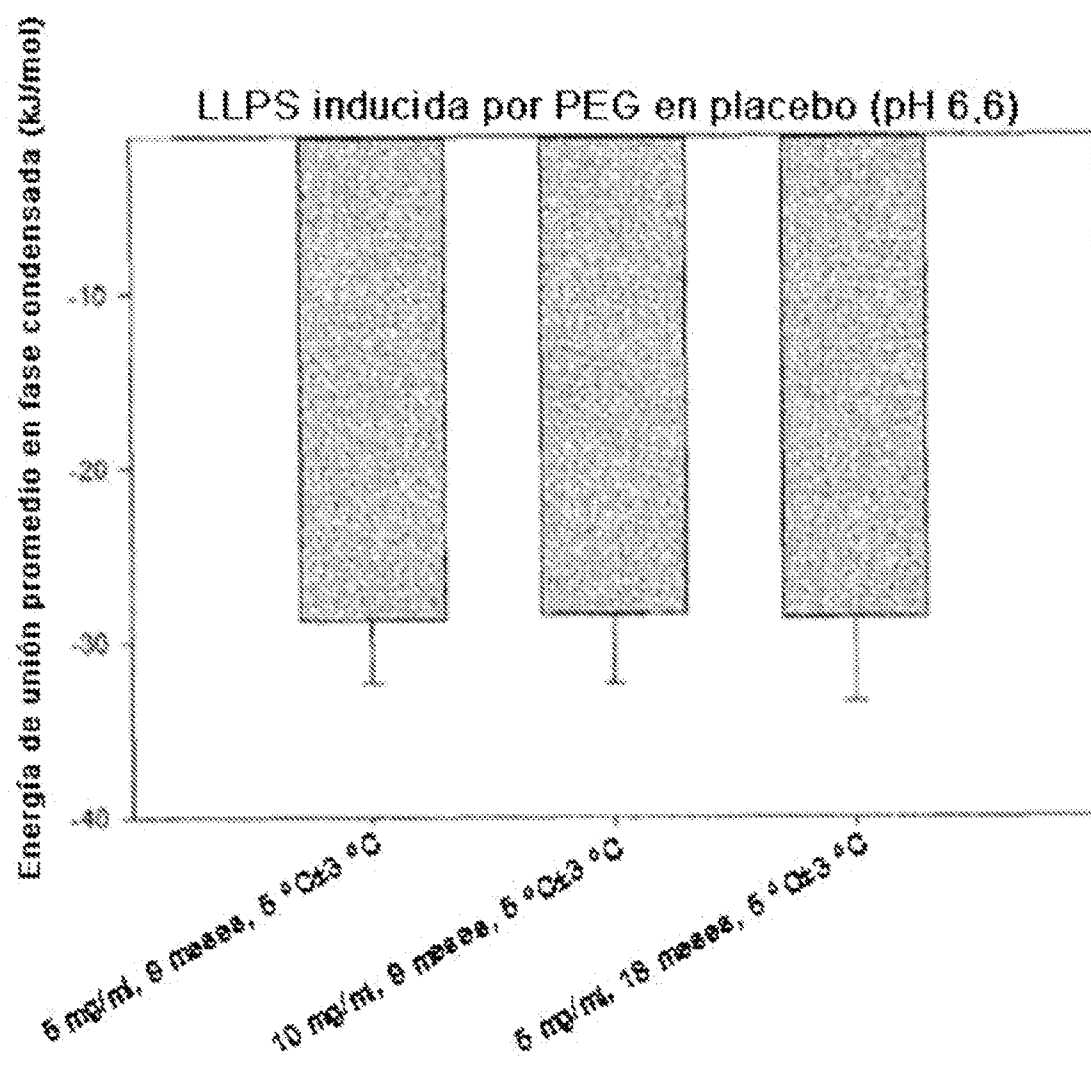
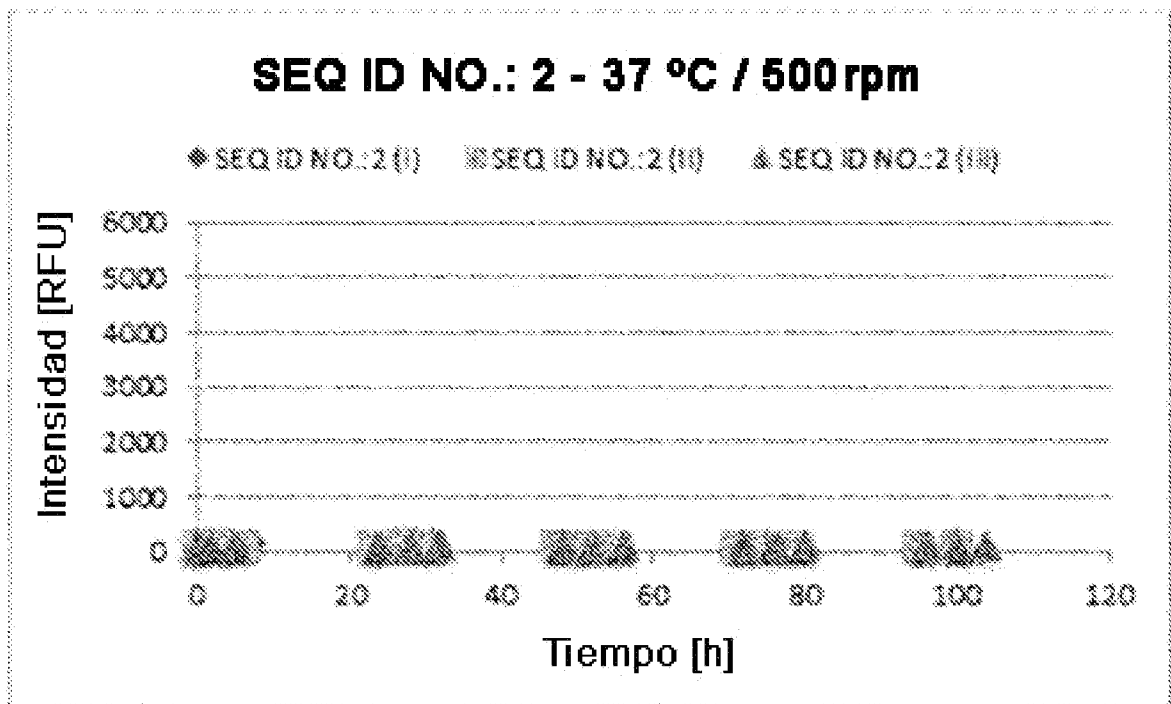


Figura 6

a)



b)

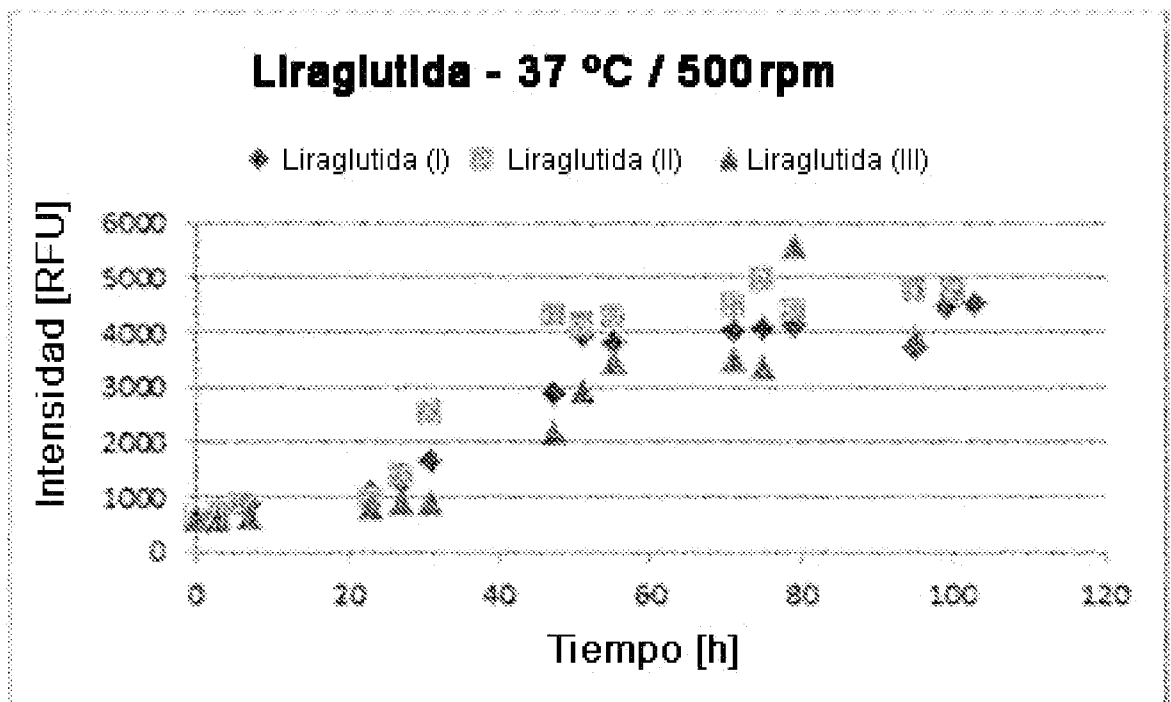


Figura 6 (continuación)

c)

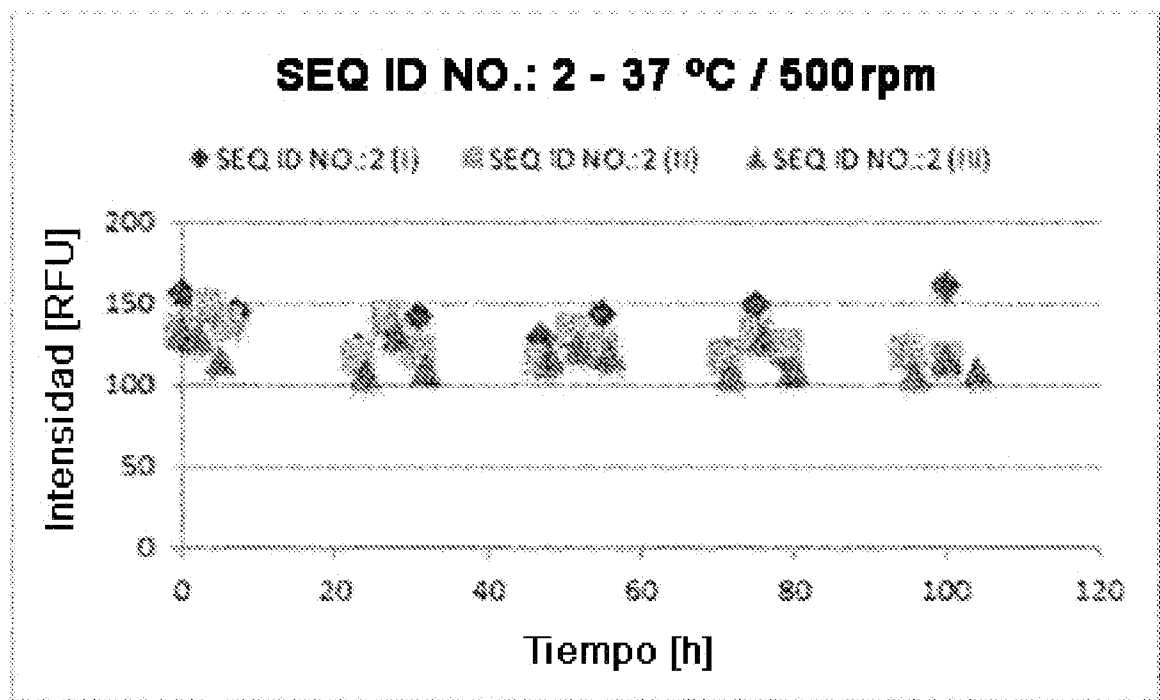


Figura 7

