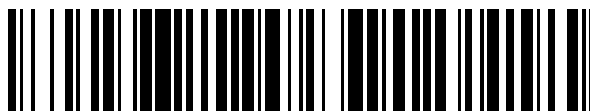


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 691**

51 Int. Cl.:
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04801396 .5**
96 Fecha de presentación: **13.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1706150**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2006**

54 Título: **Formulación líquida estable de hormonas de crecimiento**

30 Prioridad:
23.12.2003 US 531843 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.06.2012

73 Titular/es:
**PHARMACIA CORPORATION
100 ROUTE 206 NORTH
PEAPACK, NJ 07977, US**

72 Inventor/es:
**BADKAR, Advait;
NEMA, Sandeep y
WADHWA, Manpreet**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 383 691 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

Formulación líquida estable de hormonas de crecimiento

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a formulaciones líquidas estables de hormonas de crecimiento, tal como la hormona de crecimiento humana, particularmente, a dichas formulaciones que permanecen estables después de un almacenamiento de larga duración, y también permanecen estables después de someterse a esfuerzo físico tal como agitación, congelación y descongelación.

Antecedentes de la invención

10 La hormona de crecimiento humana natural es una proteína con una sola cadena de polipéptido que contiene 191 aminoácidos, reticulados internamente por dos fuentes disulfuro. Las hormonas de crecimiento de otras especies animales son muy homólogas con la hormona de crecimiento humana natural, y tienen actividad biológica similar en cuanto a que son eficaces en el tratamiento de enfermedades relacionadas con las deficiencias de la hormona de crecimiento en seres humanos, tal como el enanismo hipofisiario y la osteoporosis. Se han producido también formas recombinantes de la hormona de crecimiento humana con la misma o sustancialmente similar secuencia de aminoácidos que la hormona de crecimiento humana natural e idéntica actividad biológica que la hormona natural. Excepto, que se indique de otra manera a continuación, todas las formas naturales y recombinantes de la hormona de crecimiento humana se denominan en conjunto "hGH". Debido a las similitudes estructurales entre hGH y las hormonas de crecimiento de otras especies, serían de esperar formulaciones que sean eficaces en la estabilización de hGH que también son eficaces en la estabilización de las hormonas de crecimiento de otras especies.

20 La hGH está comercializada principalmente en forma liofilizada hoy en día. Véase, por ejemplo, Polvo Liofilizado de GENOTROPINA® (Pharmacia & Upjohn Company, actualmente propiedad de Pfizer Inc.), HUMATROPE® (Eli Lilly), NORDITROPINA® para inyectables (Novo Nordisk), SAIZEN® para inyectables (Serono) y NUTROPINA® (Genentech). Las formulaciones liofilizadas tienen la ventaja de proporcionar estabilidad a las proteínas durante largos períodos. Sin embargo, una formulación liofilizada debe utilizarse poco después de la redisolución, a medida que la aglomeración y la desamidación tienden a comenzar poco después la redisolución con un diluyente acuoso. Esto significa generalmente que se deja hasta que el consumidor de una formulación liofilizada redisuella el producto poco antes de su utilización. Si la redisolución no se hace de manera apropiada, o si la formulación redisuelta se guarda durante demasiado tiempo antes de su utilización, el consumidor puede tener una dosis inapropiada de la hormona de crecimiento o una dosis que contiene concentraciones inapropiadas de los productos de degradación de la hGH. Además, la preparación de las formulaciones liofilizadas implica sustancialmente mayor coste y tiempo con relación a la preparación de las formulaciones líquidas.

35 Debido a los inconvenientes anteriores con las formulaciones de hGH liofilizadas, varias formulaciones líquidas de hGH se han desarrollado durante los últimos años, cada una con grados variables de estabilidad en varias condiciones de almacenamiento y manipulación. Dos formulaciones comerciales líquidas de hGH se venden bajo las denominaciones de la marca comercial NUTROPINA AQ® (Genentech, Inc.) y NORDITROPINA® (Novo Nordisk). La composición de éstas y otras formulaciones líquidas de hGH se ha dado a conocer en patentes publicadas y aplicaciones de patentes publicadas, resumidas a continuación. Cada una de las siguientes referencias pone de manifiesto que las formulaciones líquidas de las formulaciones de hGH descritas en la presente memoria son estables a las temperaturas de refrigeración, a aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 8°C, excepto donde se indica de otra manera a continuación. Si embargo, ninguna reivindicación para dar a conocer formulaciones que puedan resistir la exposición a la congelación y descongelación, condiciones a las que los productos pueden exponerse en el trayecto. Por otra parte, la hGH en algunas de las formulaciones dadas a conocer anteriormente se degrada o experimenta aglomeración cuando se somete a agitación física, por ejemplo, durante el transporte. Estos tipos de inestabilidades no solamente originan desperdicio del producto costoso, sino que también puede dar lugar a problemas de seguridad si el producto degradado se administra involuntariamente a un paciente.

45 La patente de EE.UU. n° 5.567.677 (inventada por Castensson *et al.*; transferida a PHARMACIA AB) da a conocer una formulación acuosa constituida por la hormona de crecimiento y el tampón de citrato en una cantidad de 2 a 50 mM a un pH de aproximadamente 5,0 a 7,0. La patente '677 también da a conocer que el manitol y la glicina pueden estar incluidos de manera adecuada en la formulación dada a conocer en la presente memoria.

50 Las patentes de EE.UU. n° 5.763.394 y n° 5.981.485 (inventada por O'Connor *et al.*; transferida a GENENTECH, INC.) da a conocer una formulación acuosa de la hormona de crecimiento humana que contiene hGH, un tampón que proporciona pH 5,5 a pH 7 (p. ej., citrato sódico), 0,1% a 1% p/v de tensioactivo no iónico (p. ej., polisorbato 20) y, 50 a 200 mM de una sal neutra (p. ej., cloruro sódico) y un conservante (p. ej., fenol), en la que dicha formulación está exenta de glicina y manitol.

55 La patente de EE. UU. n° 6.022.858 (inventada por Sorensen *et al.*; transferida a NOVO NORDISK A/S), da a conocer una solución acuosa tamponada que contiene una hormona de crecimiento humana pretratada con sal de zinc, y que contiene opcionalmente lisina o ion calcio.

La patente de EE. UU. nº 5.849.704 (inventada por Sorensen *et al.*; transferida a NOVO NORDISK A/S), da a conocer una solución acuosa tamponada que contiene una hormona de crecimiento tamponada con histidina y derivado de histidina.

5 La patente de EE. UU. nº 5.977.069, la patente de EE. UU. nº 5.631.225 y la patente de EE. UU. nº 5.547.696 (inventadas por Sorensen *et al.*; transferida a NOVO NORDISK A/S), dan a conocer unas soluciones acuosas tamponadas que contienen una hormona de crecimiento humana con cantidades estabilizantes de los aminoácidos asparagina, isoleucina o valina, respectivamente.

10 La patente de EE.UU. nº 5.705.482 y la patente de EE.UU. nº 5.552.385 (inventadas por Christensen *et al.*, transferidas a NOVO NORDISK A/S), dan a conocer soluciones acuosas tamponadas que contienen una hormona de crecimiento humana con cantidades estabilizantes de los péptidos Leu-His-Leu y Lys-Gly-Asp-Ser respectivamente.

15 El documento WO 01/03741 A1 (para una invención de Siebold *et al.*; transferida a GRANDIS BIOTECH GMBH) da a conocer una "formulación líquida estable al almacenamiento de la hormona de crecimiento consistente esencialmente en hormona de crecimiento en solución isotónica tamponada con fosfato" y además reivindica formulaciones con tampón fosfato y un tensioactivo no iónico presente a una concentración de 0,2% o inferior. En el apartado Ejemplos de la publicación, el único tensioactivo no iónico utilizado es Pluronic F-68 a una concentración de 0,2% (p/v) en cada una de las formulaciones en las que se incluyó.

20 El documento WO 02/067989 A1 (para una invención de Siebold *et al.*; transferida a GRANDIS BIOTECH GMBH) se refiere a "una formulación acuosa de la hormona de crecimiento que comprende hormona de crecimiento y (a) tampón de citrato de pH aproximadamente 5,6 o más, o (b) otro tampón aparte de citrato de pH aproximadamente 6,0 o más, y sustancialmente exento de cristalización durante el almacenamiento". Las únicas temperaturas adecuadas durante el almacenamiento de las formulaciones descritas son la temperatura de refrigeración (4°C a 8°C) y superiores, o en un intervalo de temperaturas de 8°C a 25°C.

25 La publicación de la solicitud de EE.UU. nº 2002/0077461 (para una invención de Bjorn *et al.*; transferida a NOVO NORDISK OF NORTH AMERICA INC.) da a conocer formulaciones farmacéuticas que comprenden la hormona de crecimiento (p. ej., hGH), un aminoácido seleccionado de entre el grupo consistente en asparagina, isoleucina, valina, leucina, histidina, un derivado de histidina o un péptido que comprende al menos un resto de aminoácido básico y al menos un resto de aminoácido básico, y un detergente no iónico (p. ej., un polisorbato o un polixámero). La solicitud también da a conocer dichas formulaciones con un tampón (p. ej., histidina, citrato, tartrato o fosfato) para pH 6 a pH8, un agente tonificante (p. ej., manitol), los únicos estudios de estabilidad dados a conocer en esta solicitud se llevaron a cabo a temperaturas refrigeradas o superiores.

35 El documento WO 01/24814 A1 (para una invención de Chen *et al.*; transferida a CHIRON CORPORATION) da a conocer la utilización de un aminoácido básico suficiente para disminuir la formación de agregados durante el almacenamiento para estabilizar formulaciones acuosas de polipéptidos, en las que el aminoácido básico comprende al menos un aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Esta solicitud publicada da a conocer también la inclusión de estabilizantes adicionales de dichas formulaciones, incluyendo antioxidantes, tal como metionina, y tensioactivos no iónicos. La interleucina-2 es el único polipéptido cuya estabilización que utiliza dicha formulación se ilustra en la presente memoria.

40 La patente de EE.UU. nº 6.593.296 B1 da a conocer formulaciones acuosas que comprenden la hormona de crecimiento, tampón (pH 5,0-7,5) y uno o más agentes estabilizantes seleccionados del grupo constituido por tensioactivos no iónicos del copolímero de bloque polioxitileno-polioxiopropileno (Pluronic), sales biliares y derivados de metilcelulosa.

45 La patente de EE.UU. nº 5.206.219 da a conocer un medio codisolvente líquido disolvente poliol-lípido en el que está disuelto un medicamento proteico biológicamente activo. En particular, esta patente da a conocer una formulación líquida que comprende, entre otros ingredientes, hormona de crecimiento (1,83%), tampón fosfato (pH 7,5-7,8), polietilenglicol 400 (23,53%) y Tween 80 (2,95%).

50 Las formulaciones comerciales líquidas de hGH actualmente disponibles en el comercio incluyen fenol como conservante. Véase, por ejemplo, NUTROPINA AQ® (formulación líquida de hGH recombinante comercializada por Genentech Inc.), y NORDITROPINA® (formulación líquida de hGH recombinante comercializada por Novo Nordisk). Sin embargo, se sabe que el fenol favorece la agregación de hGH, especialmente en la congelación y descongelación (véase Maa, Yuh-Fun, *et al.*, *Internat. J. Pharm.* 140: 155-168 (1996)).

55 Incluso con todos los avances que se han hecho hasta la fecha en el desarrollo de las formulaciones que estabilizan las hormonas de crecimiento en particular y los polipéptidos en general la estabilidad de hGH en las formulaciones líquidas continúa siendo un problema. La estabilidad es particularmente problemática en las formulaciones líquidas de hGH expuestas a congelación y posterior descongelación, especialmente cuando está presente un excipiente fenólico (p. ej., un conservante fenol). Incluso una sola congelación-descongelación puede dar formulaciones líquidas conocidas de hGH, tales como las formulaciones comerciales citadas anteriormente, inadecuadas para utilización humana, debido a la aglomeración de proteínas y la formación de precipitado.

Hay necesidad de una formulación líquida de hGH que permanezca estable en condiciones de congelación-descongelación, así como en otras condiciones de esfuerzo físico, tal como agitación física, con la condición de que la formulación además permanezca estable después de un largo período de almacenamiento, en condiciones adecuadas de almacenamiento. Dicha formulación podría almacenarse no solamente en un frigorífico, como son las formulaciones comerciales de hGH actuales, podría además almacenarse en un congelador.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a una formulación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de hormona de crecimiento en solución acuosa, un tampón que mantiene el pH de la formulación a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, un tensioactivo no iónico, un polímero estabilizante, metionina y opcionalmente que comprende además uno o más excipientes seleccionados de entre el grupo constituido por: un catión divalente presente en una sal de magnesio seleccionada de entre el grupo constituido por hidróxido de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, citrato de magnesio y edetato de magnesio; un agente tonificante; y un conservante, en la que la formulación permanece estable después de al menos un episodio de congelación y descongelación posterior; en la que dicho polímero estabilizante se selecciona de entre el grupo constituido por polietilenglicol y derivados de polietilenglicol.

Otra forma de realización se refiere a una formulación que comprende, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de una forma recombinante de la hormona de crecimiento humana en solución acuosa, un tampón de citrato o edetato que mantiene la formulación a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, aproximadamente 0,04% a aproximadamente 5% (p/p) de un tensioactivo polisorbato, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20% (p/v) de polietilenglicol, metionina y opcionalmente que comprende además uno o más excipientes seleccionados de entre el grupo constituido por: una concentración suficiente de sorbitol para la formulación que es aproximadamente isotónica, cloruro de magnesio o hidróxido de magnesio, un conservante en el que la formulación permanece estable después de al menos un episodio de congelación y descongelación. En una forma de realización específica, la formulación permanece estable después de por lo menos tres episodios de congelación y descongelación. En una forma de realización específica la formulación permanece estable después de por lo menos seis episodios de congelación y descongelación.

Las formulaciones líquidas de la presente invención son estables en presencia o ausencia de conservantes fenólicos tal como fenol, aun después de exposición a múltiples episodios de congelación-descongelación. Este resultado es sorprendente, en vista de lo cual es conocido actualmente con respecto al efecto de los compuestos fenólicos sobre la agregación de la hormona de crecimiento (véase, p. ej., Maa, Yuh-Fun, *et al.*, anteriormente).

Las formulaciones de la presente invención son también sorprendentemente estables en condiciones de manipulación física y agitación, tal como la agitación a la que están expuestas las formulaciones en el proceso de transporte de una parte de un país a otra o de una parte del mundo a otra.

Las formulaciones de la presente invención, además, son sorprendentemente resistentes a la degradación durante las condiciones recomendadas de almacenamiento de larga duración, tal como el almacenamiento bajo refrigeración de 2°C a 8°C. En una forma de realización específica la formulación permanece estables durante al menos 52 semanas de almacenamiento entre 2°C y 8°C. Las presentes formulaciones son incluso resistentes a la degradación después de almacenamiento a temperaturas en el punto de congelación o inferiores.

Tal como se utilizan en la presente memoria, la terminología "hormona de crecimiento humano" y "hGH" se refieren a la hormona de crecimiento humano producida por procedimientos que incluyen la extracción y purificación de las fuentes de tejido humano natural, y de sistemas de cultivo recombinante transformados con el ácido desoxirribonucleico que codifica la hormona de crecimiento humano. La secuencia y características de la hGH están publicadas, por ejemplo, en *Hormone Drugs*, Gueriguian *et al.*, U.S.P. Convention Rockville Maryland (1982). La misma terminología, utilizada en la presente memoria, se refiere también a análogos de agonista de hGH, que contienen sustitución, eliminación y/o inserción de aminoácidos. La misma terminología, que la utilizada en la presente memoria, se refiere también a los análogos de agonistas de hGH que tienen por lo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con 191 formas de aminoácidos naturales de la hGH. Dos especies de hGH de interés particular incluyen las 191 especies naturales de aminoácidos (somatotropina) y las 192 especies del aminoácido N-terminal metionina (met) (somatrem) obtenidas normalmente por medios recombinantes.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" de hGH se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico en un régimen de administración.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "episodio de congelación-descongelación" se refiere a la exposición de una solución líquida u otra formulación a una temperatura inferior a la del punto de congelación, por lo general en un congelador a menos 20°C o menos 70°C hasta que la solución esté congelada, seguido de descongelación a una temperatura superior a la de su punto de congelación, por lo general a 2°C a 8°C en un frigorífico, o a temperatura ambiente. Las muestras congeladas y descongeladas dos o más veces según éste procedimiento se dice que han experimentado múltiples episodios de congelación-descongelación.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de hGH recuperado, medido por análisis HPLC de exclusión por tamaños en formulaciones líquidas de hGH disponibles en el mercado antes y después de ser expuestas a seis episodios de congelación-descongelación, como se describe en el ejemplo 1.
- 5 La figura 2 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de hGH recuperado, medido por análisis HPLC de exclusión por tamaños en formulaciones líquidas de hGH de la presente invención después de la exposición a congelaciones-descongelaciones, y después de la exposición a agitación por transporte, como se describe en el ejemplo 2.
- 10 La figura 3 es un gráfico de barras del porcentaje total de hGH formadas, medidos por HPLC de intercambio aniónico, de formulaciones líquidas de hGH de la presente invención, en comparación con una formulación líquida de hGH conocida anteriormente, después de seis meses de almacenamiento a 5°C, y después de seis semanas de almacenamiento a 25°C, como se describe en el ejemplo 3.
- 15 La figura 4 es un gráfico de barras del porcentaje total de variantes de hGH, medidos por HPLC de intercambio aniónico, de formulaciones líquidas de hGH de la presente invención, preparada con varios tampones, después de 18 semanas de almacenamiento a 5°C, como se describe en el ejemplo 4.
- La figura 5 es un gráfico de barras del porcentaje total de recuperación de hGH, medido utilizando análisis de absorbancia de proteínas, en formulaciones líquidas de hGH preparadas con varios agentes tónicos, después de la exposición a agitación física forzada, como se describe en el ejemplo 5.
- 20 La figura 6 es un gráfico de barras del porcentaje total de recuperación de hGH, medido utilizando análisis de absorbancia de proteínas, en formulaciones preparadas con varias concentraciones de tensioactivo no iónico polisorbato, después de la exposición a agitación física forzada, como se describe en el ejemplo 6.
- La figura 7 es un gráfico de barras del porcentaje total de las variantes de hGH formadas, medido utilizando HPLC en fase inversa, en formulaciones líquidas de hGH de la presente invención, preparadas con y sin metionina, como se describe en el ejemplo 6, después de 31 semanas de almacenamiento a 5°C.
- 25 La figura 8 es un gráfico de barras del porcentaje total de las variantes de hGH, medido utilizando HPLC en fase inversa, en formulaciones líquidas de hGH de la presente invención, preparadas con y sin reactivos de magnesio, después de aproximadamente 2 meses de almacenamiento a 5°C, como se describe en el ejemplo 8.
- La figura 9 es un gráfico de la ganancia de peso acumulada observada a lo largo del tiempo en ratas hipofisectomizadas, después de administrar las inyecciones diarias de formulaciones líquidas de hGH indicadas en la presente memoria, en comparación con ratas inyectadas con una solución placebo de referencia que no contiene hGH, ("PBS"). -□- representa la formulación 6 del ejemplo 3. -△- representa la formulación 5 del ejemplo 3. -◇- representa la formulación 8 del ejemplo 3. -O- representa la referencia PBS.
- 30 La figura 10 es un gráfico de barras del porcentaje total de monómero de hGH, medido utilizando HPLC de exclusión por tamaños, en formulaciones líquidas de hGH de la presente invención después de aproximadamente 53 semanas de almacenamiento a 5°C, como se describe en el ejemplo 11. Las formulaciones 32 a 37 son formulaciones de la presente invención e Y y Z son respectivamente las formulaciones simuladas de NUTROPINA AQ® y NORDITROPINA SIMPLEXX®.
- 35 La figura 11 es un gráfico de barras del porcentaje total de hGH, medido utilizando HPLC en fase inversa, en formulaciones líquidas de hGH de la presente invención después de aproximadamente 53 semanas de almacenamiento a 5°C, como se describe en el ejemplo 11. Las formulaciones 32 a 37 son formulaciones de la presente invención e Y y Z son respectivamente las formulaciones simuladas de NUTROPINA AQ® y NORDITROPINA SIMPLEXX®.
- 40 La figura 12 es un gráfico de barras del porcentaje total de hGH desamidada, medido utilizando HPLC de intercambio aniónico, en formulaciones líquidas de hGH de la presente invención después de aproximadamente 53 semanas de almacenamiento a 5°C, como se describe en el ejemplo 11. Las formulaciones 32 a 37 son formulaciones de la presente invención e Y y Z son respectivamente las formulaciones simuladas de NUTROPINA AQ® y NORDITROPINA SIMPLEXX®.
- 45 La figura 13 es un gráfico de barras del porcentaje total de hGH, medido utilizando HPLC de intercambio aniónico, en formulaciones líquidas de hGH de la presente invención después de aproximadamente 53 semanas de almacenamiento a 5°C, como se describe en el ejemplo 11. Las formulaciones 32 a 37 son formulaciones de la presente invención e Y y Z son respectivamente las formulaciones simuladas de NUTROPINA AQ® y NORDITROPINA SIMPLEXX®.
- 50

Descripción detallada de la invención

La cantidad terapéuticamente eficaz de hGH en cualquier forma de realización dada de la formulación de la presente invención dependerá del volumen de la formulación que se suministre a cualquier paciente dado, así como de la edad y del peso de la persona, y de la naturaleza de la enfermedad o trastorno que se está tratando. Cuando la formulación ha de suministrarse a una persona, la formulación contiene al menos aproximadamente 0,1 g/ml a aproximadamente 20 mg/ml de hGH, aproximadamente de 0,5 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml de hGH, o aproximadamente 0 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de hGH.

El tampón incluido en la formulación de la presente invención mantiene el pH de la formulación a aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 7. En otra forma de realización, el tampón mantiene el pH de la formulación a aproximadamente pH 5,7 a aproximadamente pH 6,5. Todavía en otra forma de realización, el tampón mantiene el pH de la formulación a aproximadamente pH 6. Cualquier tampón que sea capaz de mantener el pH de la formulación en cualquier intervalo de pH dado aproximadamente es adecuado para su utilización en las formulaciones de la presente invención, con tal que no reaccione con otros componentes de la formulación para producir precipitados visibles para formar después una o más congelaciones-descongelaciones o después de agitación en el transporte, o sino dar lugar a que la hormona de crecimiento se desestabilice químicamente. El tampón utilizado en la presente invención comprende un componente seleccionado del grupo constituido por citrato, succinato, maleato, edetato, histidina, acetato, adipato, aconitato, ascorbato, benzoato, carbonato, bicarbonato, maleato, glutamato, fosfato y tartrato. Los tampones específicos incluyen edetato o citrato como componentes. Ejemplos de tampones adecuados para su utilización en las formulaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, citrato sódico, edetato sódico, succinato sódico e hidrocloreuro de histidina. Las formas de realización específicas son tampones de edetato sódico y citrato sódico.

El tampón está presente en una concentración suficiente para mantener el pH de la formulación dentro del un intervalo de pH descrito anteriormente. La concentración de tampón en la formulación es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, alternativamente aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM o alternativamente alrededor de 4 mM a alrededor de 20 mM.

El tensioactivo no iónico y el polímero estabilizante utilizados en la formulación de la presente invención se seleccionan por su capacidad para estabilizar la hGH sin dar lugar a hGH u otros componentes de la formulación para precipitar fuera de la solución después de experimentar al menos un episodio de congelación-descongelación o después de experimentar manipulación y agitación física. El tensioactivo no iónico puede ser un polisorbato, un poloxámero o Pluronic, u otro polímero de bloque etileno/polipropileno. En una forma de realización específica el tensioactivo no iónico es un polisorbato, que puede ser polisorbato 20 y polisorbato 80.

El polímero estabilizante incluido en la formulación líquida de la presente invención se selecciona de entre el grupo constituido por polietilenglicol y derivados de polietilenglicol. En una forma de realización ilustrativa, el polímero estabilizante es polietilenglicol de cualquier peso molecular, dentro de un intervalo medio de peso molecular de aproximadamente 400 a aproximadamente 100.000 kDa, y específicamente un intervalo de peso molecular de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 20.000 kDa. En estos intervalos de peso molecular están disponibles muchas formas comerciales de poli(etileno)glicol (conocido también como "PEG"), incluyendo PEG 400, PEG 3350, PEG 8000 y PEG 20.000. En las formulaciones de la presente invención, se ha observado que la adición de glicoles de poli(etileno) de varios pesos moleculares mejora la estabilidad de la hGH a la agitación física así como la congelación-descongelación.

El tensioactivo no iónico y el polímero estabilizante están cada uno presente en una cantidad suficiente de manera que el tensioactivo y el estabilizante juntos estabilizan la formulación de hGH a la agitación física así como a los episodios de congelación-descongelación. En otra forma de realización, la cantidad de tensioactivo presente en la formulación es una cantidad que estabilizaría la formulación de hGH en agitación física, aun en ausencia del polímero estabilizante.

La utilización de tensioactivos no iónicos tal como polisorbatos y poloxámeros a una concentración de 0,1% o superior para estabilizar las formulaciones líquidas de hGH se ha dado a conocer anteriormente (Patente de EE. UU. nº 5.763.394 y nº 5.981.485 (O'Connor *et al.*; GENENTECH); documento EP 0955062 A1 (O'Connor *et al.*; GENENTECH). Los únicos dos tipos de formulaciones líquidas de hGH disponibles en el mercado utilizan Polisorbato 20 al 0,2% (NUTROPIN AQ®) y Poloxámero 188 al 0,3% (NORDITROPIN®). De forma inesperada, se ha descubierto que las formulaciones líquidas de la presente invención proporcionan excelente estabilidad física de hGH, aun con concentraciones de tensioactivo no iónico muy inferiores a 0,1%.

El tensioactivo no iónico en la formulación líquida estable de hGH de la presente invención está presente a una concentración de aproximadamente 0,2% (p/p) a aproximadamente 10% (p/p), alternativamente a una concentración de aproximadamente 0,04% (p/p) a aproximadamente 5% (p/p) o alternativamente a una concentración de aproximadamente 0,05% (p/p) a aproximadamente 1% (p/p).

El polímero estabilizante está presente a una concentración de al menos aproximadamente 0,001%, y está presente de manera adecuada a una concentración de hasta el 70%. En las formulaciones en las que se desea que la

viscosidad se mantenga en un mínimo, por ejemplo, para facilitar el suministro de la formulación por inyección, se utiliza una concentración relativamente baja de polímero estabilizante. En dichas condiciones, el polímero estabilizante está presente a una concentración de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 20%, como alternativa aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10% o como alternativa aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5%.

En otra forma de realización la formulación de la presente invención comprende además un agente tonificante. El agente tonificante puede actuar también como un agente estabilizante más en la formulación líquida hGH de la presente invención. Los agentes tonificantes adecuados incluyen sales neutras y carbohidratos, tales como alcoholes de azúcar, monosacáridos y disacáridos. Los agentes tonificantes de carbohidratos adecuados incluyen mono-, bi- o polisacáridos no reductores, o polioles o sales neutras, incluyendo manitol, sorbitol, lactitol, xilitol, sacarosa, trehalosa, cloruro sódico y cloruro potásico. El agente tonificante de carbohidratos pueden ser manitol, sorbitol, sacarosa o trehalosa o sorbitol. Se ha descubierto que las formulaciones de la presente invención preparadas con cada uno de los cuatro últimos agentes tonificantes son estables tras la exposición a episodios de congelación-descongelación, agitación física y almacenamiento de larga duración. Sin embargo, se descubrió que el sorbitol tiene un efecto estabilizante sobre la hGH frente a la agitación física en ausencia de otros estabilizantes. Esto es sorprendente, ya que para una formulación líquida de hGH dada a conocer anteriormente, se ha demostrado la utilización de manitol como agente tonificante y estabilizante (p. ej., la patente de EE.UU. nº 5.567.677) e incluso en otro caso se ha demostrado la utilización de cloruro sódico como agente tonificante y estabilizante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.763.394).

Cuando está presente un agente tonificante, puede estar presente en una cantidad suficiente para preparar la formulación isotónica, y adecuada para la inyección parenteral en un mamífero, tal como un paciente humano, en los tejidos dérmico, subcutáneo o intramuscular. Dependiendo de las concentraciones de los demás componentes en la formulación, el sorbitol está presente en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM, como alternativa aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM o como alternativa 200 mM a aproximadamente 300 mM.

La presente formulación comprende un aminoácido estabilizante, especialmente metionina. Varios aminoácidos estabilizantes se han descrito para estabilizar las proteínas, incluyendo hGH en formulaciones líquidas (véase, por ejemplo, la utilización de glicina en la patente de EE.UU. nº 5.567.677 (Carstenson *et al.* PHARMACIA) y la utilización de histidina, valina, isoleucina, asparagina y lisina, en varias patentes (Sorensen *et al.*, NOVO NORDISK, anteriormente). El aminoácido estabilizante incluido en la formulación es el que ayuda además a la estabilidad química a la formulación durante el almacenamiento, sin producir ninguna inestabilidad física después de uno o más episodios de congelación-descongelación o después de la exposición a agitación física. Se descubrió inesperadamente que la cisteína reduce la estabilidad química de las formulaciones líquidas de hGH de la presente invención, cuando está presente en ésta. La metionina, por otra parte se ha descubierto que mejora la estabilidad química de hGH en las presentes formulaciones.

La utilización de metionina como antioxidante en las formulaciones con proteínas se ha publicado en la bibliografía, ya que las proteínas tienden a experimentar oxidación espontánea. Sin embargo, no se ha publicado que la metionina estabiliza la hGH en las formulaciones líquidas. De hecho, se observó que la metionina no mejoraba la estabilidad química de hGH, ni sus características de oxidación en ningún grado significativo cuando faltaba el componente estabilizador del polímero de la presente formulación. Inesperadamente, en presencia de un polímero estabilizante, tal como polietilenglicol, se observó que la adición de metionina tiene un efecto beneficioso sobre la estabilidad.

En otra forma de realización, la formulación comprende además un catión divalente. La formulación no está limitada por la naturaleza del catión divalente. Cationes divalentes a título de ejemplo son el magnesio, el calcio y el zinc. El catión divalente puede ser una sal que contiene magnesio, tal como cloruro de magnesio, sulfato de magnesio o hidróxido de magnesio. La cantidad de magnesio que contiene sal en la formulación está presente a una concentración molar que es inferior a la concentración molar del tampón, a fin de no reducir en gran medida la capacidad tamponante del tampón por acomplejamiento, pero suficientemente elevada para mejorar la estabilidad química de la formulación.

En otra forma de realización, la formulación comprende opcionalmente un conservante, tal como fenol y alcohol bencílico. Las cantidades de conservante en la formulación están presentes a una concentración relativamente baja que no desestabiliza química o físicamente la hGH, e incluso están presentes en una concentración suficiente que proporciona actividad antimicrobiana adecuada para la acción conservante.

Una forma de realización específica de la presente invención es una formulación que comprende aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de una forma recombinante de hormona de crecimiento humana en solución acuosa, aproximadamente 4 a aproximadamente 20 mM de un tampón de edetato o citrato que mantiene la formulación a un pH de aproximadamente 6, aproximadamente 0,05% (p/p) a aproximadamente 1% (p/p) de un tensioactivo de polisorbato, aproximadamente 0,05% (p/p) a aproximadamente 5% (p/p) de un polímero de polietilenglicol, y metionina, en la que la formulación permanece estable después de al menos un episodio de congelación-descongelación. En una forma de realización específica la formulación permanece estable después de

por lo menos tres episodios de congelación-descongelación. En una forma de realización específica la formulación permanece estable después de por lo menos seis episodios de congelación-descongelación. Esta forma de realización de la presente formulación opcionalmente incluye un agente tonificante, como se describió anteriormente. Esta forma de realización de la formulación también incluye opcionalmente un reactivo de magnesio, como se describió anteriormente. Esta forma de realización de la formulación incluye además opcionalmente un conservante, como se describió anteriormente.

Las formulaciones de la presente invención, permanecen estables después de la exposición a un solo episodio, e incluso a múltiples episodios de congelación-descongelación. Las formulaciones de la presente invención además permanecen estables incluso después de la exposición a agitación física, tal como sería de esperar encontrar durante el transporte del producto desde una localidad a otra. La estabilidad puede medirse de numerosas maneras diferentes, incluyendo la inspección visual para la formación del precipitado, análisis del porcentaje de proteínas que quedan en solución después de la exposición a condiciones de esfuerzo (p. ej., por HPLC de exclusión de tamaño para el monómero de hGH o por análisis de absorbancia de proteínas para la hGH total), o análisis de la formación de variantes químicas de la hormona de crecimiento (p. ej., por intercambio aniónico o análisis de HPLC en fase inversa). En una forma de realización de la presente invención, no se forma ningún precipitado visible a simple vista en la formulación después de al menos un episodio de congelación-descongelación. En una forma de realización específica la formulación permanece estable después de al menos tres episodios de congelación-descongelación. En una forma de realización específica la formulación permanece estable después de al menos seis episodios de congelación-descongelación. En otra forma de realización, al menos el 90%, del monómero de hGH en la formulación permanece en solución como se midió por análisis de HPLC de exclusión por tamaños después de al menos un episodio de congelación-descongelación.

Las formulaciones de la presente invención proporcionan además al menos el 90% de monómero de hGH en solución por análisis de HPLC de exclusión por tamaños, y además permanecen bioactivas en su totalidad tras almacenamiento durante al menos 4 semanas a 25°C, o tras el almacenamiento durante al menos 52 semanas a aproximadamente 2°C a 8°C. Debido a su resistencia a las condiciones de congelación-descongelación, las formulaciones de la presente invención pueden almacenarse de manera adecuada durante periodos prolongados a temperaturas por debajo de la congelación.

Las formulaciones de la presente invención proporcionan además al menos el 90%, específicamente al menos el 95%, específicamente al menos el 95%, específicamente al menos el 99,88% y específicamente al menos el 99,92% de recuperación de la hGH en solución medida por HPLC de exclusión por tamaños.

Las formulaciones de la presente invención proporcionan además al menos el 85%, específicamente al menos el 86% y específicamente al menos el 88% de recuperación de la hGH en solución medida por HPLC en fase inversa.

Las formulaciones de la presente invención proporcionan también menos del 7%, específicamente menos del 6% de desamidación en solución medida por HPLC de intercambio aniónico.

La presente invención se ilustra mejor mediante los ejemplos siguientes. Estos ejemplos se pretende que sean ilustrativos de la invención y no se deberían utilizar para limitar o restringir su alcance.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes ilustran una o más de las formas de realización de las formulaciones de hGH de la presente invención, descritas anteriormente. En cada una de las formulaciones de la presente invención probadas a continuación, había somatotropina, una forma recombinante de hGH. La somatotropina utilizada en los ejemplos a continuación, es la misma proteína de hGH hallada en las formas comerciales de Genotropin® (PHARMACIA & UPJOHN COMPANY). Para más información acerca de la Genotropin® véase *Physician's Desk Reference*, 57ª ed., publicada por Thompson PDR en Montvale, NJ (2003). Los ejemplos, a continuación, comparan también la estabilidad física de las formulaciones hGH de la presente invención con la estabilidad física de las formulaciones líquidas de hGH conocidas.

Ejemplo 1

Estabilidad física de las formulaciones líquidas de hGH conocidas

Se utilizó somatotropina para preparar una formulación acuosa de hGH dada a conocer en la patente de EE.UU. nº 5.567.677 (Castensson *et al.*, transferida a PHARMACIA AB). La formulación de hGH tenía la composición siguiente: mg/ml de hGH, citrato sódico 5 mM, pH 6,2, glicina 12 mM y manitol 250 mM. Esta formulación se denomina de aquí en adelante formulación "CGM".

Se obtuvieron viales de una formulación acuosa de hGH disponible en el mercado, NUTROPIN AQ®. La composición de NUTROPIN AQ®, según la etiqueta del producto, era: 5 mg/ml de hGH, citrato sódico 10 mM, 8,7 mg/ml de cloruro sódico, 2 mg/ml (0,2%) de Polisorbato 20 y 2,5 mg/ml (0,25%) de fenol. La composición de esta formulación se ha dado a conocer también la patente de EE.UU. nº 5.763.394.

Se obtuvieron también cartuchos de una formulación acuosa de hGH, NORDITROPIN® disponible en el mercado. La composición de NORDITROPIN®, según la etiqueta del producto fue 3,3 mg/ml de hGH, 0,67 mg/ml de histidina, 40 mg/ml de manitol, 3 mg/ml (0,3%) de Poloxámero 188 y 3 mg/ml (0,3%) de fenol.

5 En las tres formulaciones descritas anteriormente se analizó la estabilidad después de ser expuestas a esfuerzo físico incluyendo episodios de congelación-descongelación y agitación física. La congelación se realizó en un congelador a -20°C; la descongelación posterior se realizó a aproximadamente 5°C en un frigorífico; y el procedimiento se repitió hasta 6 veces. El ensayo de agitación física se realizó a aproximadamente 5°C utilizando una plataforma de agitador mecánico a 250 revoluciones por minuto ("RPM") durante aproximadamente 20 horas. El ensayo de agitación física se diseñó para estimular condiciones de agitación fuerte que pueden ocurrir a veces durante el transporte. La estabilidad de las formulaciones se evaluó mediante el análisis de concentración de monómero de hGH utilizando cromatografía líquida a alta presión de exclusión por tamaños (en adelante, "SE-HPLC", por sus siglas en inglés) después de cada análisis. Los valores del análisis mayores de 90% se consideraron aceptables.

15 Se descubrió que la formulación de CGM era estable después de exposición a múltiples episodios de congelación-descongelación, y esencialmente el 100% por análisis de concentración del monómero hGH. Sin embargo, esta formulación se descubrió que era inestable durante la exposición a agitación física a 5°C. Se formó un precipitado turbio en los viales después de la agitación y se recuperó menos del 10% de la proteína en solución por análisis de SE-HPLC.

20 En cambio, se observó que las formulaciones disponibles en el mercado eran estables tras la agitación física pero inestables tras la exposición a múltiples episodios de congelación-descongelación. Específicamente, ambas formulaciones comerciales examinadas permanecieron transparentes, y se recuperó esencialmente el 100% de las proteínas después de agitación forzada a 5°C. Sin embargo, ambas formulaciones comerciales se volvieron turbias después de solamente un solo episodio de congelación-descongelación, y sólo aproximadamente el 30% de las proteínas se observó en solución por análisis de concentración por SE-HPLC tras la exposición a seis episodios de congelación-descongelación.

25 En la figura 1 puede observarse un gráfico de los resultados del análisis de SE-HPLC de las tres formulaciones después de la exposición a agitación física o seis episodios de congelación-descongelación. Estos resultados se resumen en la tabla 1, a continuación. Como se puede observar en la tabla 1 y figura 1, cada una de las formulaciones líquidas de hGH conocidas analizadas en este ejemplo es inestable en condiciones de al menos un tipo de forma de esfuerzo físico, si este esfuerzo se debe a agitación física o se debe a la exposición a la congelación y descongelación.

TABLA I

Formulación	Estabilidad a la agitación forzada	Estabilidad a congelación-descongelación
"CGM"	No	Sí
NUTROPIN AQ®	Sí	No
NORDITROPIN®	Sí	No

Ejemplo 2

35 Estabilidad física de formulaciones líquidas de hGH con y sin fenol y con un tensioactivo de polisorbato y poli(etilen)glicol ("PEG")

40 Se prepararon cuatro formulaciones líquidas de hGH como se muestra en la tabla II, a continuación, con somatotropina, tampón de edetato, tensioactivo polisorbato, PEG y excipientes adicionales. Tres concentraciones de hGH (1,5 y 10 mg/ml) están representadas en las tres primeras formulaciones (formulaciones 1, 2 y 3, respectivamente), y la cuarta formulación (formulación 4) contiene 5 mg/ml de hGH y fenol al 0,3%, como conservante.

TABLA II

Composición de la formulación	1	2	3	4
Concentración de hGH	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	5 mg/ml
Tampón	Edetato sódico 10 mM	Edetato sódico 10 mM	Edetato sódico 10 mM	Edetato sódico 10 mM
Tensioactivo estabilizante	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%
Polímero estabilizante	PEG 3350 al 1%	PEG 3350 al 1%	PEG 3350 al 1%	PEG 3350 al 1%
Conservante	-	-	-	Fenol al 0,3%
Excipientes adicionales	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM, cloruro de magnesio 3 mM	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM, cloruro de magnesio 3 mM	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM, cloruro de magnesio 3 mM	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM, cloruro de magnesio 3 mM

5 Como en el ejemplo 1, en las formulaciones preparadas como se describe justo encima se analizó la estabilidad física por SE-HPLC, después de exposición a seis congelaciones-descongelaciones. En las formulaciones se analizó además la estabilidad física tras la agitación por transporte de las formulaciones tres veces entre dos ciudades (Skokie, IL y Chesterfield, MO), manteniéndolas refrigeradas entre 2°C y 8°C utilizando bolsas de gel frías.

10 Los resultados del análisis por SE-HPLC de cada formulación después de cada prueba de estabilidad física descrita anteriormente se muestran en la figura 2. Se obtuvo una recuperación mejor del 90% de hGH para las cuatro formulaciones analizadas, lo que demuestra muy buena estabilidad física a las congelaciones-descongelaciones, así como a la agitación. Se obtuvo también buena estabilidad a las congelaciones-descongelaciones aun cuando estaba presente el fenol, en contraste con los resultados observados con las formulaciones líquidas de hGH comerciales que contienen fenol analizadas como se describió en el ejemplo 1. Esto resultó sorprendente, considerando el hecho de que el fenol se sabe que estimula la aglomeración de hGH recombinante (véase Maa, Yuh-Fun, *et al.*, anteriormente).

15 Además sorprendentemente, se obtuvo buena estabilidad a la agitación aun cuando la concentración de tensioactivo era de 0,06%. Esta concentración de tensioactivo en las formulaciones de hGH analizadas en este ejemplo es mucho menos del 0,2 al 0,3% de concentración de tensioactivos no iónicos en las formulaciones líquidas comerciales de hGH analizadas en el ejemplo 1. Es además considerablemente inferior al intervalo de concentración de 0,1 a 1% reivindicado en la patente de EE.UU: nº 5.763.394.

Ejemplo 3

20 Estabilidad física y química de las formulaciones de hGH preparadas con varios tensioactivos de polisorbato y PEG de diferentes pesos moleculares

25 Se prepararon cuatro formulaciones líquidas de hGH (formulaciones 5 a 8) como se describe en la tabla III, a continuación, formulaciones que contienen 5 mg/ml de somatotropina, tampón de citrato, un tensioactivo de polisorbato, un polímero de PEG y excipientes adicionales. Se incluyeron en una de cada una de las formulaciones tres pesos moleculares diferentes de PEG (3350, 8000 y 20000) así como dos concentraciones de PEG (0,25% y 1%). Se preparó también una versión simulada de la NUTROPIN AQ® disponible en el mercado, según la fórmula proporcionada en la etiqueta del producto, como se describió en el ejemplo 1, anteriormente, como comparador.

TABLA III

Composición de la formulación	5	6	7	8
Concentración de hGH	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml
Tampón	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM
Tensioactivo estabilizante	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%
Polímero estabilizante	PEG 3350 al 1%	PEG 8000 al 1%	PEG 20000 al 1%	PEG 20000 al 0,25%
Excipientes adicionales	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM,	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM,	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM,	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM,

Como en el ejemplo 1, cada una de las formulaciones preparadas como se describe en el presente ejemplo, anteriormente, se analizó la estabilidad física por SE-HPLC, después de exposición a seis episodios de congelación-descongelación y a esfuerzo de agitación forzada. Todas las formulaciones de Genotropina[®] permanecieron transparentes a simple vista y se obtuvo más del 90% de recuperación de hGH, medida por SE-HPLC, para todas las formulaciones **5 a 8** de la tabla III, después de someterse a uno de los dos tipos de esfuerzo físico. En cambio, en la versión simulada de NUTROPIN AQ[®] se observó turbidez visual después de los episodios de congelación-descongelación; y, de promedio, sólo se obtuvo aproximadamente el 70% de recuperación de monómero hGH.

Se analizó también cada una de las formulaciones por HPLC de intercambio aniónico (AEX-HPLC, por sus siglas en inglés) para evaluar la formación de variantes de la proteína de hGH después 6 meses de almacenamiento refrigerado entre 2°C y 8°C y después de 6 semanas de almacenamiento a 25°C. Aunque, por lo menos algunas de las variantes de hGH detectadas por AEX-HPLC se sabía que eran terapéuticamente activas, este procedimiento proporcionó una medida relativa de la estabilidad química de la hGH. Específicamente, este método de análisis permite a uno medir las concentraciones de las variantes de hGH formadas a lo largo del tiempo, incluyendo las especies desamidadas.

En la figura 3 se ilustran los resultados del análisis por AEX-HPLC. Los resultados representados en la misma demuestran que AEX-HPLC detectó concentraciones similares de variantes de hGH para todas las formulaciones de Genotropina a cada temperatura. Las concentraciones de las variantes eran inferiores en las formulaciones 5 a 8, en comparación con las observadas en la formulación de NUTROPIN AQ[®] simulada (formulación X en la figura 3). Estos resultados indican excelente estabilidad química con relación a la formulación líquida de hGH conocida incluso aparte de la excelente estabilidad física. Los datos demuestran también que pueden utilizarse diferentes pesos moleculares y concentraciones de polímero PEG para producir formulaciones líquidas de hGH con similar estabilidad química y física.

Ejemplo 4

Estabilidad física y química de las formulaciones de hGH preparadas con tensioactivo polisorbato, PEG y varios tampones

Se prepararon seis formulaciones líquidas de hGH (formulaciones **9 a 14**) que contenían 5 mg/ml de somatotropina, varios tampones, un tensioactivo de polisorbato, un polímero de PEG y excipientes adicionales, como se describe en la tabla IV a continuación. Se utilizaron seis tampones diferentes a una concentración de 50 mM (citrato, succinato, malato, edetato, bicarbonato e histidina) para preparar una de cada una de las formulaciones, a pH 6.

TABLA IV

Composición de la formulación	9	10	11	12	13	14
Concentración de hGH	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml
Tampón	Citrato sódico 50 mM	Succinato sódico 50 mM	Malato sódico 50 mM	Edetato sódico 50 mM	Bicarbonato sódico 50 mM	Hidrocloreto de histidina 50 mM
Tensioactivo estabilizante	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%
Polímero estabilizante	PEG 20000 al 1%	PEG 20000 al 1%	PEG 20000 al 1%	PEG 20000 al 1%	PEG 20000 al 1%	PEG 20000 al 1%
Excipientes adicionales	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM,	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM,	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM,	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM,	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM,	Sorbitol 250 mM, metionina 10 mM,

Se observó que las seis formulaciones analizadas tenían muy buena estabilidad física. Específicamente, se observó que las seis formulaciones eran estables después de la exposición a agitación y a seis episodios de congelación-descongelación, como se describe en el ejemplo 2.

En las seis formulaciones se analizó también la estabilidad química utilizando AEX-HPLC, después de 18 semanas de almacenamiento a 5°C. Los resultados de los análisis de estabilidad química se ilustran en la figura 4. Como se muestra en la figura 4, se observaron pequeñas diferencias en la estabilidad química. La formulación **12**, con tampón

de edetato, produjo el mínimo número de variantes de hGH en la prueba de estabilidad química. Sin embargo, los resultados de la prueba de estabilidad química indicaron que todas las formulaciones eran comparables, lo que sugiere que podría utilizarse adecuadamente una variedad de tampones para producir formulaciones líquidas estables de hGH del tipo descrito en la tabla IV, anteriormente.

5 Ejemplo 5

Estabilidad física de formulaciones de hGH con varios agentes tonificantes

Se prepararon cuatro formulaciones líquidas de hGH (formulaciones **15** a **18**), como se describe en la tabla V, a continuación, con 5 mg/ml de somatotropina, tampón citrato y con uno de cada uno de los cuatro agentes tonificantes diferentes (manitol, sorbitol, sacarosa y trehalosa). Obsérvese que ninguna de las cuatro formulaciones analizadas en este ejemplo contenía estabilizantes adicionales, tal como un polímero estabilizante o tensioactivo no iónico.

TABLA V

Composición de la formulación	15	16	17	18
Concentración de hGH	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml
Tampón	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM
Agente tonificante	Manitol 250 mM	Sorbitol 250 mM	Sacarosa 250 mM	Trehalosa 250 mM

Se observaron partículas a simple vista en las muestras de las cuatro formulaciones, después de agitación forzada en un agitador mecánico a 250 RPM durante 24 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). La figura 5 es un gráfico del tanto por ciento de recuperación de hGH observado en cada formulación, por análisis de proteínas, después de la etapa de agitación forzada. El tanto por ciento de recuperación de hGH de la formulación que contiene manitol (fórmula **15**) fue aproximadamente del 90%, una tasa de recuperación muy buena para una formulación sin ningún estabilizante adicional. Sin embargo la mejor recuperación de hGH después de la agitación (casi 100%) se obtuvo con la formulación **16**, formulación preparada con sorbitol. Este último resultado sugiere que sorbitol tiene un efecto estabilizante sobre hGH sola y es un agente tonificante preferible a utilizar en las formulaciones líquidas de hGH.

Se observó estabilidad química similar entre el conjunto de cuatro formulaciones líquidas de hGH preparadas con estos cuatro agentes tonificantes como se describió anteriormente.

25 Ejemplo 6

Estabilidad física de las formulaciones de hGH con menos de 0,1% de concentración de tensioactivo

Se prepararon cinco formulaciones líquidas diferentes de hGH (formulaciones **19** a **23**), como se describe en la tabla VI, a continuación. Cada formulación contenía 5 mg/ml de somatotropina, tampón citrato, un agente tonificante (manitol) y varias concentraciones de polisorbato 20 (0,02, 0,04, 0,06 y 0,08%).

TABLA VI

Composición de la formulación	19	20	21	22	23
Concentración de hGH	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml
Tampón	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM
Agente tonificante	Manitol 250 mM	Manitol 250 mM	Manitol 250 mM	Manitol 250 mM	Manitol 250 mM
Tensioactivo	-	Polisorbato 20 al 0,02%	Polisorbato 20 al 0,04%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,08%

5 Como en el ejemplo 5, se hizo el seguimiento de la recuperación de hGH por análisis de absorbancia de proteínas después de la agitación forzada a temperatura ambiente. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 6. Como se muestra en la figura 6, se obtuvo el 100% de recuperación de proteínas de unas formulaciones que contenían una concentración de polisorbato tan baja como 0,04% (formulación **21**), y se observó una recuperación mejorada incluso en las formulaciones en las que la concentración de polisorbato era tan baja como 0,02% (formulación **20**).

Ejemplo 7

Estabilidad química de formulaciones líquidas de hGH que contienen metionina como aminoácido estabilizante

10 Se prepararon cuatro formulaciones líquidas de hGH, formulaciones **24** a **27**, como se describe en la tabla VII, a continuación. Cada formulación contenía 5 mg/ml de proteína Genotropina[®] de hGH, tampón citrato para un pH de 6, tensioactivo polisorbato, sorbitol y PEG; con dos de las formulaciones adicionales que contienen metionina y dos sin metionina.

TABLA VII

Composición de la formulación	24	25	26	27
Concentración de hGH	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml
Tampón	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM
Agente tonificante	Sorbitol 250 mM	Sorbitol 250 mM	Sorbitol 250 mM	Sorbitol 250 mM
Estabilizante del tensioactivo	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%
Estabilizante del polímero	PEG 3350 al 1%	PEG 20000 al 1%	PEG 3350 al 1%	PEG 20000 al 1%
Aminoácido estabilizante	-	-	Metionina 10 mM	Metionina 10 mM

15 La estabilidad química de cada una de las cuatro formulaciones descritas inmediatamente antes se evaluó por HPLC en fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés). Como en la AEX-HPLC, la RP-HPLC permite la detección de variantes de la proteína de hGH. Aunque estas variantes se sabe que son terapéuticamente activas, el método proporciona una medición relativa de la estabilidad química de hGH.

20 La figura 7 es una representación de los resultados del análisis de estabilidad química. Como se muestra en la figura 7, después de 31 semanas a 5°C, el análisis RP-HPLC indicaba que las formulaciones **26** y **27** de hGH que contenían metionina tenían concentraciones inferiores de las variantes de la proteína en comparación con las formulaciones **24** y **25** que no tenían metionina. La presencia de la metionina añadida no tuvo ningún efecto estabilizante sobre las formulaciones líquidas de hGH preparadas al principio sin PEG. Inesperadamente, sin embargo, se observó que la metionina mejoraba la estabilidad química de las formulaciones líquidas de hGH analizadas en este ejemplo, en el que el polímero PEG no estaba presente. Es de esperar que las formulaciones de la presente invención podrían combinarse también con otros estabilizantes de aminoácido (p. ej., histidina, leucina, valina y asparagina) para estabilizar más las formulaciones líquidas de hGH.

Ejemplo 8

Estabilidad química de las formulaciones de hGH que contienen magnesio como catión divalente estabilizante

30 Se prepararon cuatro formulaciones líquidas de hGH (formulaciones **28** a **31**), como se describe en la tabla VIII, a continuación. Cada formulación contenía 5 mg/ml de somatotropina, tampón, tensioactivo polisorbato, polímero estabilizante y aminoácido estabilizante. Dos de las formulaciones (formulaciones **29** y **31**) contenían también un reactivo de magnesio, mientras que las otras dos (formulaciones **28** y **30**) se prepararon sin magnesio.

35

TABLA VIII

Composición de la formulación	28	29	30	31
Concentración de hGH	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml
Tampón	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 5 mM	Citrato sódico 10 mM	Citrato sódico 10 mM
Tensioactivo estabilizante	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%	Polisorbato 20 al 0,06%
Polímero estabilizante	PEG 20000 al 1%	PEG 20000 al 1%	PEG 3350 al 1%	PEG 3350 al 1%
Excipientes adicionales	Sorbitol 250 mM, Metionina 10 mM	Sorbitol 250 mM, Metionina 10 mM	Sorbitol 250 mM, Metionina 10 mM	Sorbitol 250 mM, Metionina 10 mM
Reactivo de magnesio	-	Hidróxido de magnesio 2,5 mM	-	Cloruro de magnesio 3 mM

Las formulaciones **28** y **29** se analizaron por RP-HPLC, después de 9 semanas de almacenamiento a 25°C. Las formulaciones **30** y **31** se analizaron después de 8 semanas de almacenamiento a 25°C. En ambas series de formulaciones analizadas, las concentraciones menores de las variantes de proteína se observaron en formulaciones en las que el reactivo de magnesio estaba presente (**29** y **31**), lo que indica una estabilidad de hGH mejorada en presencia de magnesio.

Estos resultados son sorprendentes porque las divulgaciones anteriores han descrito el efecto estabilizante del calcio y del zinc en las formulaciones de hGH (véase la patente de EE.UU. nº 6.022.858), pero no del magnesio. Es de esperar que las formulaciones de la presente invención podrían también combinarse de manera apropiada con otros cationes divalentes, tales como los iones calcio y zinc.

Ejemplo 9

Bioactividad de las formulaciones de hGH preparadas con tampón, tensioactivo no iónico, polímero estabilizante y excipientes adicionales

En las formulaciones **5**, **6** y **8** del ejemplo 3, anteriormente, se analizó la bioactividad después de 6 semanas de almacenamiento a 25°C inyectando una vez al día en ratas hipofisectomizadas por separado utilizando un método de bioanálisis para hGH que cumple con la Farmacopea Europea. Se inyectó solución salina tamponada con fosfato (PBS) como referencia. Los resultados de este estudio se ilustran en la figura 9 y confirman que las formulaciones mantenían la bioactividad completa, lo que es de esperar si las formulaciones tienen estabilidad adecuada al almacenamiento. Todas las formulaciones de hGH produjeron el nivel esperado de crecimiento de la rata mientras que la formulación de referencia (PBS), no dio lugar a crecimiento.

Ejemplo 10

Eficacia antimicrobiana de las formulaciones de hGH que contienen fenol como conservante

En la formulación **4** del ejemplo 2 (véase tabla II), que contenía 5 mg/ml de hGH, tampón de edetato sódico 10 mM, polisorbato 20 al 0,06%, PEG 3350 al 1%, fenol al 0,3% y excipientes adicionales, se analizó la eficacia antimicrobiana frente a dos microorganismos representativos (*E. coli* y *A. niger*). La formulación presentaba actividad antimicrobiana adecuada por los criterios de aceptación descritos en la Farmacopea de Estados Unidos, demostrando que opcionalmente puede añadirse un conservante a la formulación con actividad antimicrobiana esperada.

Ejemplo 11

Almacenamiento de larga duración de formulaciones líquidas de Genotropina

Se prepararon seis formulaciones líquidas de hGH (formulaciones **32** a **37**) como para la tabla IX, a continuación, las formulaciones contienen 5 mg/ml de somatotropina, tampón de citrato o edetato (pH 6,0), sorbitol 250 mM,

5 polisorbato 20 (0,06% p/p), polímero PEG 3350 (1% p/p), metionina 10 mM y alguna de las formulaciones incluían cloruro de magnesio y algunas contenían fenol como conservante. Se prepararon también versiones simuladas de NUTROPIN AQ® y NORDITROPIN® disponibles en el mercado, según la fórmula proporcionada en la etiqueta del producto (Y & Z). La composición de NUTROPIN AQ®, según la etiqueta del producto era: 5 mg/ml de hGH, citrato sódico 10 mM, 8,7 mg/ml de cloruro sódico, 2 mg/ml de Polisorbato 20 (0,2%) y 2,5 mg/ml de fenol (0,25%). La composición de esta formulación se ha descrito también en la patente de EE.UU. nº 5.763.394. La composición de NORDITROPIN®, según la etiqueta del producto, fue: 3,3 mg/ml de hGH, 0,67 mg/ml de histidina, 40 mg/ml de manitol, 3 mg/ml de Poloxámero 188 (0,3%) y 3 mg/ml de fenol (0,3%).

TABLA IX

Formulación nº	Citrato sódico (mM)	Edetato disódico (mM)	MgCl ₂ (mM)	Fenol (% p/p)
32	10	-	-	-
33	-	10	-	-
34	10	-	3	-
35	-	10	3	-
36	10	-	3	0,3
37	-	10	3	0,3

10 Cada una de las formulaciones preparadas como se describe en el presente ejemplo, anteriormente, se mantuvo en las condiciones de almacenamiento propuestas (2-8°C) durante 53 semanas. Las muestras se analizaron a las 8, 16, 28 y 53 semanas. En cada punto de tiempo, se analizaron en las muestras a simple vista la presencia de partículas, cambio de color y transparencia. Se realizaron también mediciones de pH. La presencia de aglomerados se controló por SE-HPLC. Todas las formulaciones, probadas en este ejemplo permanecieron transparentes a simple vista, incoloras y sin partículas y no presentaban ningún cambio de pH significativo. Además, se obtuvo más del 99% de recuperación de hGH, analizada por SE-HPLC, en todas las formulaciones 32 a 37 de la tabla IX, y todos los comparadores analizados en este ejemplo, después de someterse a almacenamiento entre 2 y 8°C durante 53 semanas (figura 10).

20 Cada una de las formulaciones se analizó por HPLC en fase inversa (RP-HPLC) para evaluar la formación de variantes de la proteína de hGH después de 53 semanas de almacenamiento refrigerado (5°C). Aunque, se conoce por lo menos alguna de las variantes de hGH detectadas por RP-HPLC que son terapéuticamente activas, este procedimiento proporciona una medición de la recuperación de hGH y puede utilizarse como una indicación de % de pureza de hGH.

25 Los resultados del análisis por RP-HPLC se ilustran en la figura 11. Los resultados representados en la misma demuestran claramente que todas las formulaciones con Genotropina presentaban mayor % de recuperación de hGH después del almacenamiento entre 2 y 8°C después de 53 semanas. Las formulaciones **33** y **35** (tampón edetato) presentaban el mayor % de recuperación seguidas por las formulaciones **32** y **34** (tampón citrato). Las formulaciones con Genotropina que contenían conservante (fenol al 0,3%) presentaban recuperación en el intervalo de 86,9 a 87,3%. En cambio, los productos comparadores simulados (NUTROPIN® y NORDITROPIN®) presentaban recuperación en el intervalo de 85,5 a 87,3%.

35 Cada una de las formulaciones se analizó también por HPLC de intercambio aniónico (AEX-HPLC, por sus siglas en inglés) para evaluar la formación de variantes de la proteína hGH después de 53 semanas de almacenamiento refrigerado (5°C). Este procedimiento proporciona una buena medición de la estabilidad química de hGH; específicamente este método de análisis permite medir las concentraciones de las variantes de hGH formadas a lo largo del tiempo, incluyendo las especies desamidadas.

40 Los resultados del análisis AEX-HPLC se ilustran en la figura 12 (desamidación total) y en figura 13 (recuperación de hGH). Los resultados representados en éstas demuestran que AEX-HPLC detectó concentraciones menores o similares de las variantes de hGH para todas las formulaciones con Genotropina que los comparadores. Las concentraciones de las variantes son menores en las formulaciones **32** a **35** y **37**, en comparación con las encontradas en NUTROPIN AQ® y NORDITROPIN® simuladas (formulaciones Y y Z en las figuras 12 y 13). Estos resultados indican que las formulaciones con Genotropina presentan excelente estabilidad química y estabilidad física con relación a las dos formulaciones líquidas de hGH conocidas, disponibles en el mercado.

45

REIVINDICACIONES

1. Una formulación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de hormona de crecimiento en solución acuosa, un tampón que mantiene el pH de la formulación a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, un tensioactivo no iónico, un polímero estabilizante, metionina y opcionalmente que comprende además uno o más excipientes seleccionados de entre el grupo que consiste en hidróxido de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, citrato de magnesio y edetato de magnesio; un agente tonificante; y un conservante, en la que la formulación permanece estable después de al menos un episodio de congelación y descongelación posterior; en la que dicho polímero estabilizante se selecciona de entre el grupo que consiste en polietilenglicol y derivados de polietilenglicol.
2. La formulación de la reivindicación 1, en la que la hormona de crecimiento humano es una forma recombinante de hormona de crecimiento humana.
3. La formulación de la reivindicación 2, en la que la hormona de crecimiento humano está presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml.
4. La formulación de la reivindicación 1, en la que el tampón se selecciona del grupo que consiste en: citrato sódico, edetato sódico, succinato sódico e hidrocloreuro de histidina.
5. La formulación de la reivindicación 1, en la que el tensioactivo no iónico está presente a una concentración de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 10%.
6. La formulación de la reivindicación 1, en la que el tensioactivo no iónico es un polisorbato seleccionado de entre el grupo que consiste en polisorbato 20 y polisorbato 80.
7. La formulación de la reivindicación 1, en la que el polímero estabilizante está presente a una concentración de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 70%, de preferencia de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5%.
8. La formulación de la reivindicación 1, en la que el polímero estabilizante es polietilenglicol que tiene un peso molecular comprendido en el intervalo de aproximadamente 3000 a aproximadamente 20.000.
9. La formulación de la reivindicación 1, en la que el agente tonificante es sorbitol.
10. La formulación de la reivindicación 1, en la que el conservante se selecciona de entre el grupo que consiste en fenol y alcohol bencílico.
11. Una formulación que comprende, aproximadamente de 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de una forma recombinante de hormona de crecimiento humana en solución acuosa, un tampón de citrato o edetato que mantiene la formulación a un pH de aproximadamente de 5 a aproximadamente 7, aproximadamente de 0,04% a aproximadamente 5% (p/p) de un tensioactivo polisorbato, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20% (p/v) de polietilenglicol, metionina y opcionalmente que comprende además uno o más excipientes seleccionados de entre el grupo que consiste en: una concentración suficiente de sorbitol para la formulación que es aproximadamente isotónica, cloruro de magnesio o hidróxido de magnesio, un conservante en el que la formulación permanece estable después de al menos un episodio de congelación y descongelación.
12. La formulación de la reivindicación 11, en la que el conservante es fenol o alcohol bencílico.
13. La formulación de la reivindicación 11, en la que por lo menos aproximadamente el 90% de hGH permanece en solución tras la exposición de la formulación a tres o más episodios de congelación y descongelación.
14. La formulación de la reivindicación 11, en la que la formulación es estable de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C durante al menos 52 semanas.
15. La formulación de la reivindicación 14, en la que después del almacenamiento durante 12 meses de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C el aglomerado total medido por HPLC de exclusión por tamaños es inferior a aproximadamente 0,5%, y/o la desaminación total medida por HPLC de intercambio aniónico es inferior a aproximadamente 7%, y/o la recuperación de la hGH medida por HPLC de fase inversa es mayor o igual al 85%.

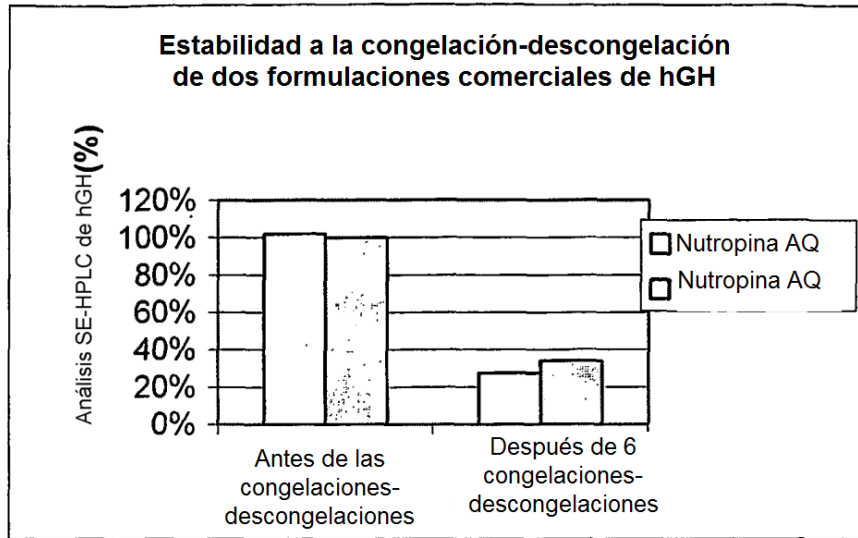


FIG. 1

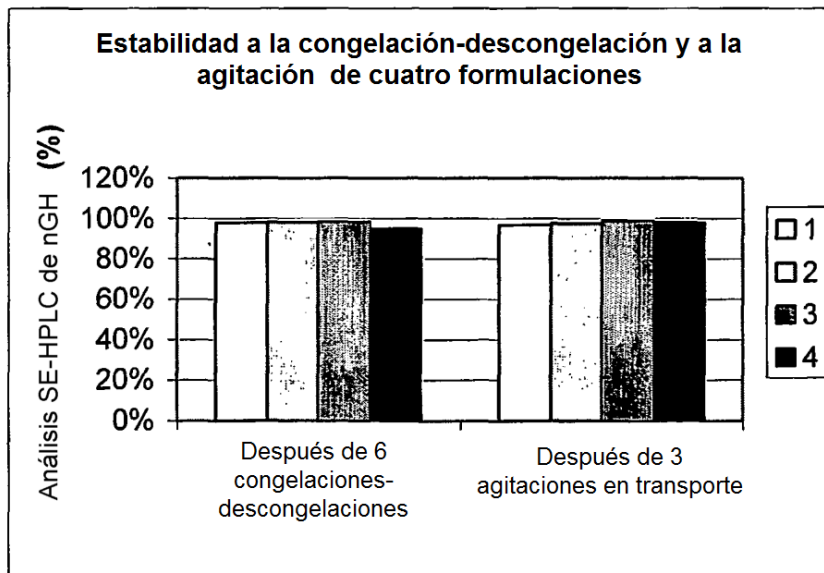


FIG. 2

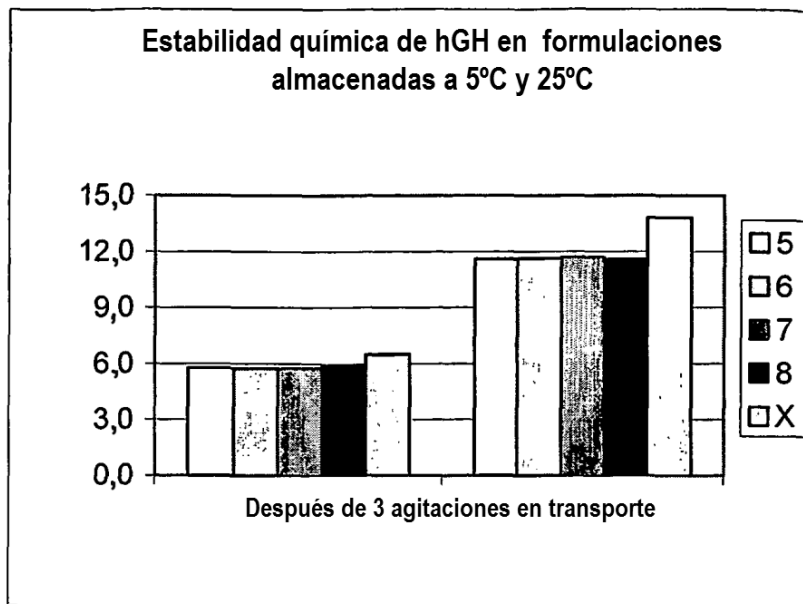


FIG. 3

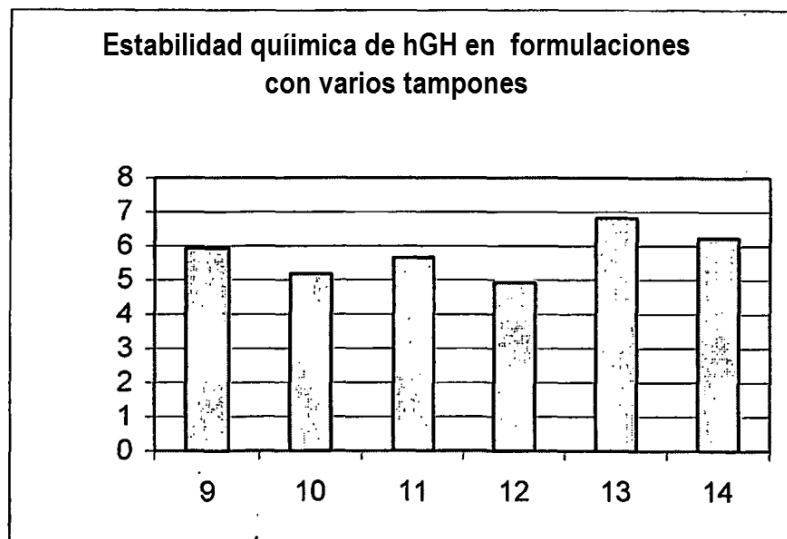


FIG. 4

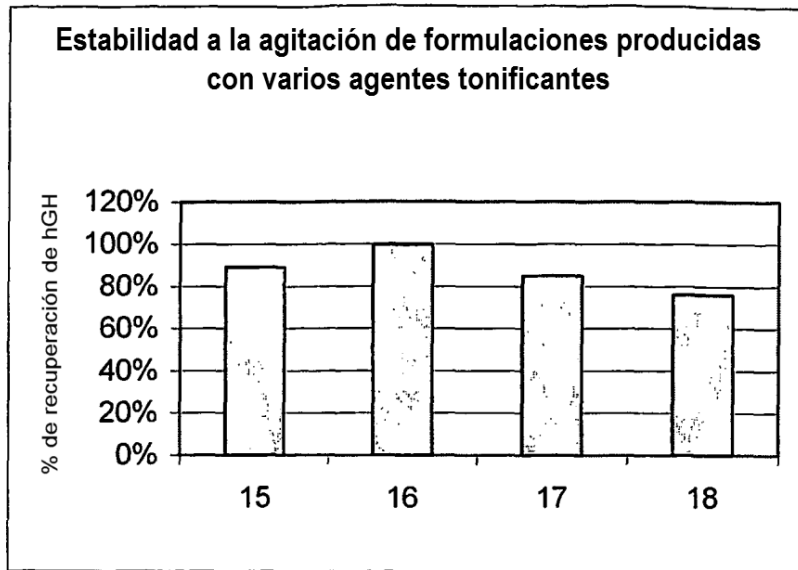


FIG. 5

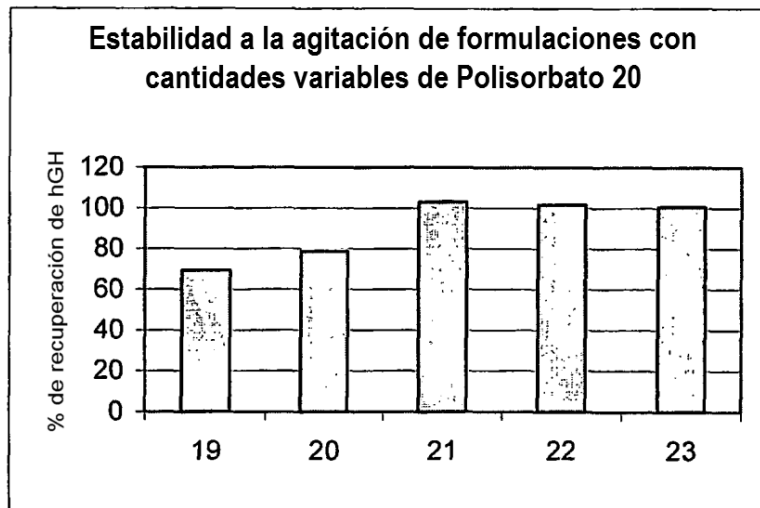


FIG. 6

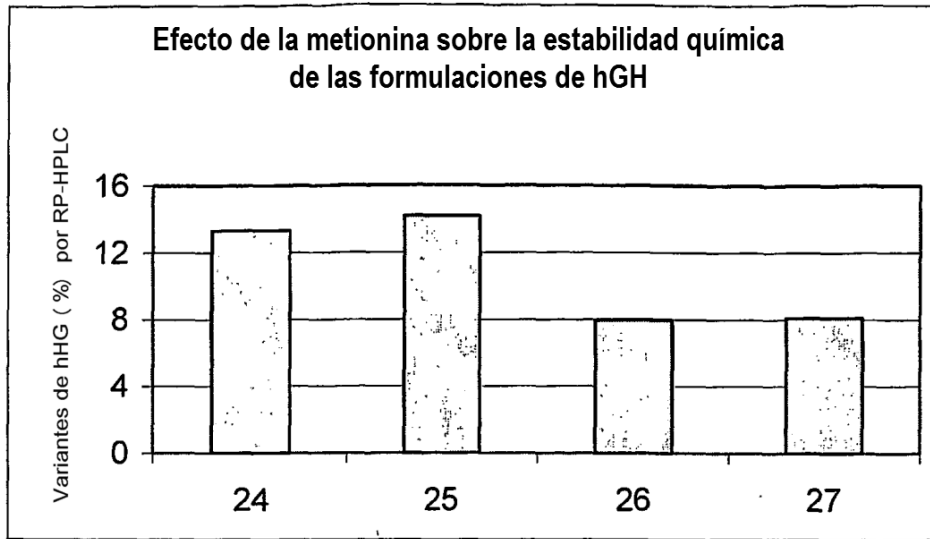


FIG. 7

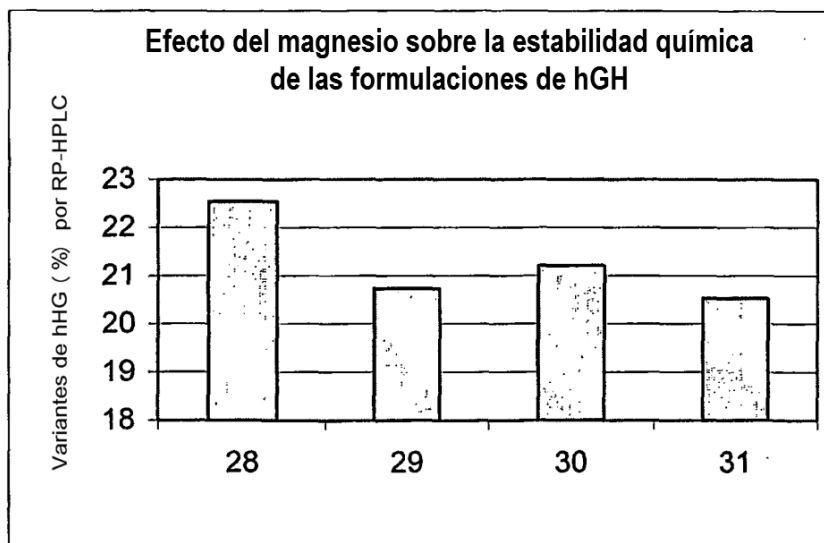


FIG. 8

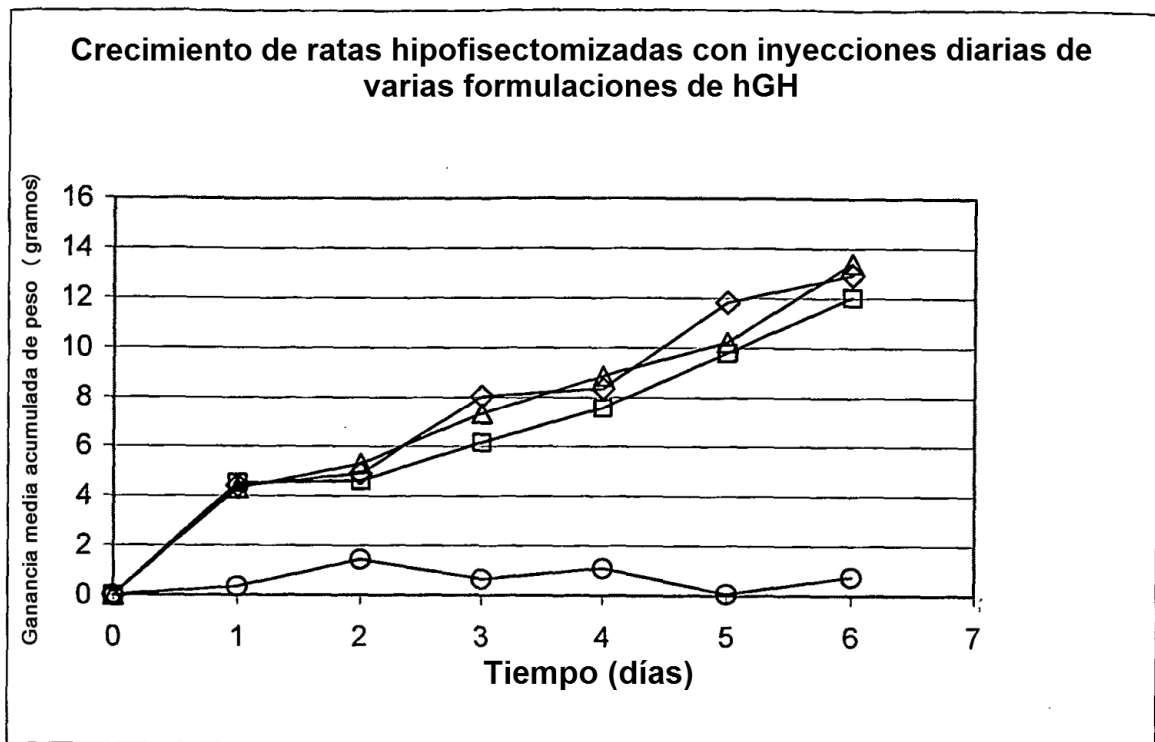


FIG. 9

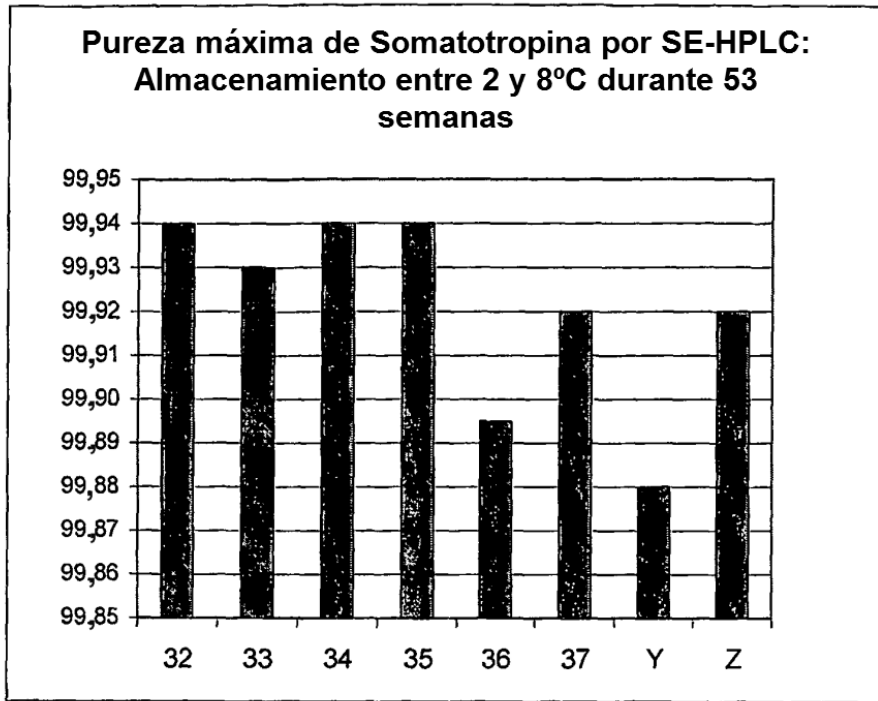


FIG. 10

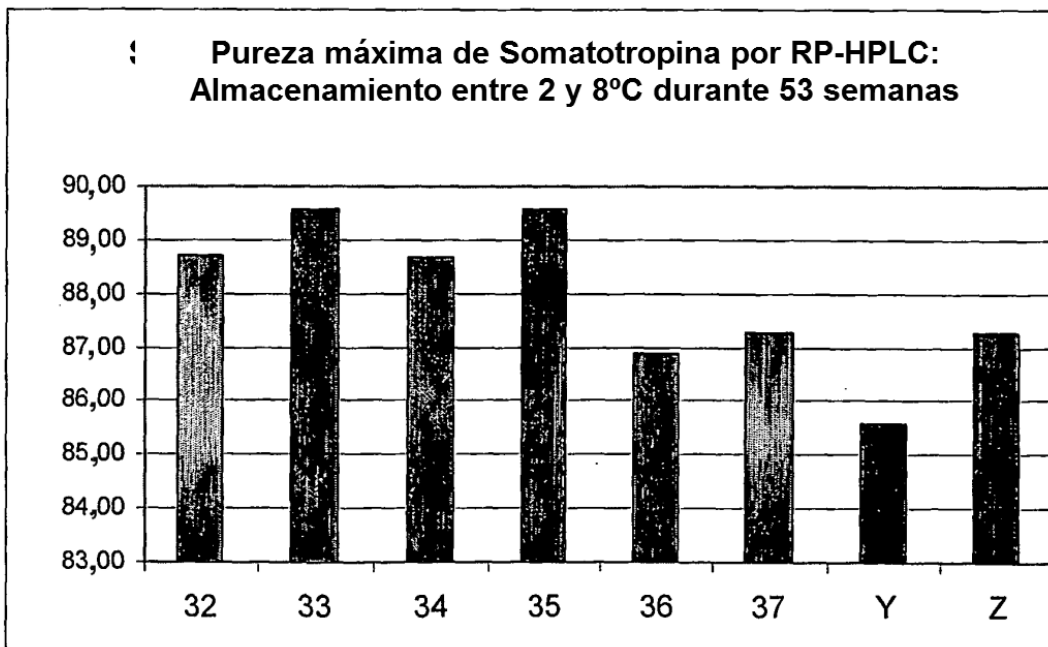


FIG. 11

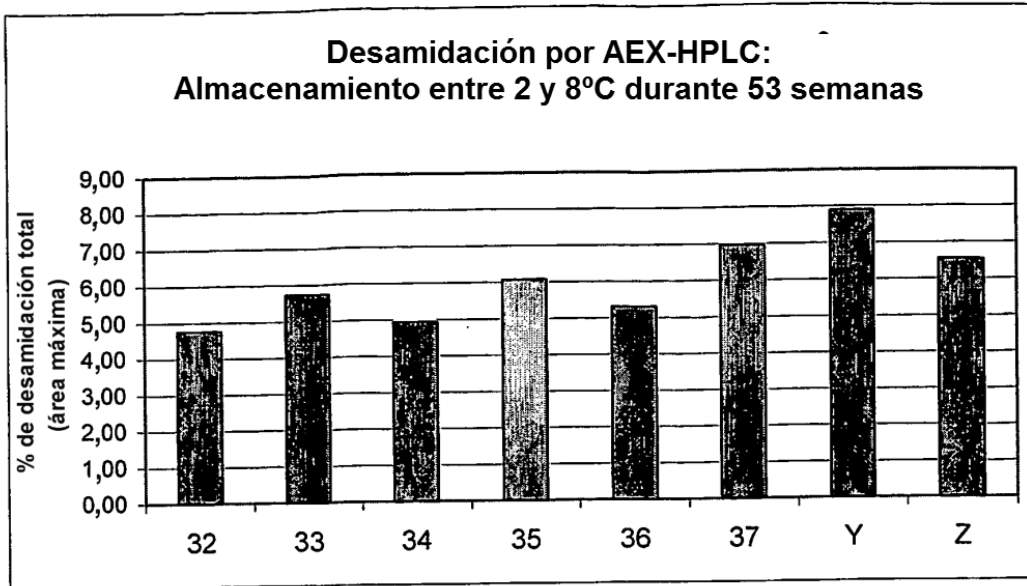


FIG. 12

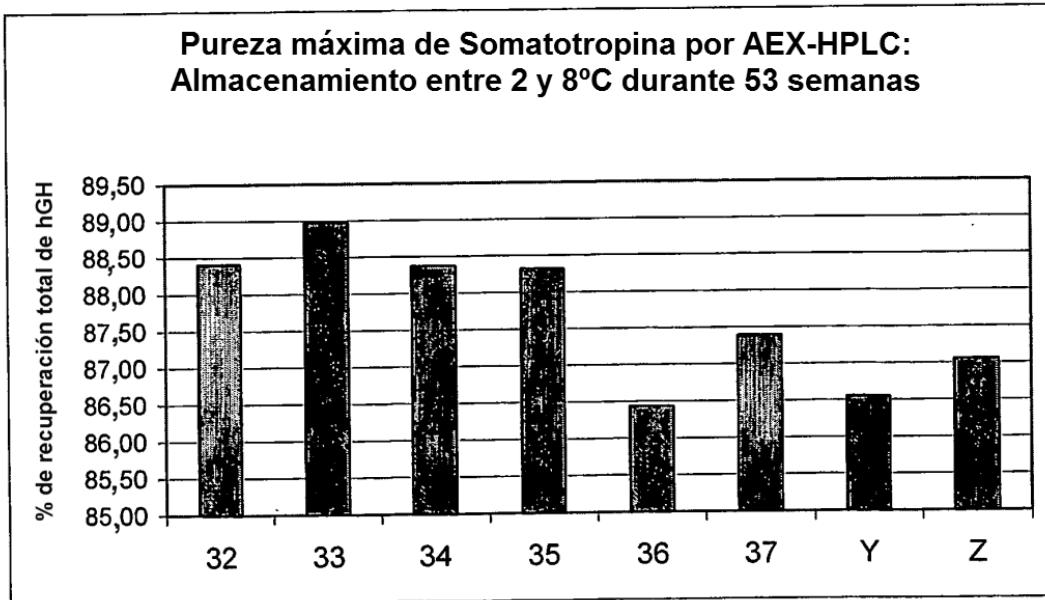


FIG. 13