

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 994**

51 Int. Cl.:

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 38/27 (2006.01)

A61P 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05774044 .1**

96 Fecha de presentación: **30.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1740213**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2007**

54 Título: **Formulación líquida de hormona del crecimiento**

30 Prioridad:
07.04.2004 EP 04101444

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.06.2012

73 Titular/es:
**ARES TRADING S.A.
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ
1170 AUBONNE, CH**

72 Inventor/es:
**ARVINTE, Tudor y
LUET KLEIBER, Karine**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 383 994 T3

DESCRIPCIÓN

Formulación líquida de hormona del crecimiento

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a formulaciones líquidas de hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) y, en particular, a formulaciones líquidas de hormona del crecimiento humana (hGH) con estabilidad química y física mejorada. Las formulaciones líquidas de hormona de crecimiento (GH) de la presente invención se pueden conservar durante periodos prolongados de tiempo a temperatura ambiente. La presente invención se refiere, adicionalmente, a un procedimiento para la preparación de tales formulaciones líquidas de GH, y a una forma de presentación de las mismas.

10 Antecedentes de la invención

La hormona del crecimiento humana (hGH), conocida también como somatropina (DCI) o somatotropina, es una hormona proteica producida y liberada por las células somatotropas de la pituitaria anterior. La hormona del crecimiento humana juega un papel clave en el crecimiento somático durante la infancia y en el metabolismo en la edad adulta a través de sus efectos sobre el metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos.

15 La hormona del crecimiento humana es una cadena polipeptídica única de 191 aminoácidos (Bewly et al., 1972) con dos enlaces disulfuro, uno situado entre Cys-53 y Cys-165, que forma un bucle de gran tamaño en la molécula, y el otro entre Cys-182 y Cys-189, que forma un bucle pequeño, próximo al extremo C-terminal. Martial et al. (1979) dieron a conocer la secuencia de ADN que confirmó la secuencia de aminoácidos. La hGH purificada es un polvo blanco amorfo en su forma liofilizada. Es fácilmente soluble (concentraciones > 10 mg/l) en soluciones tampón acuosas a un pH dentro del intervalo de 6,5 a 8,5.

20 En solución, la hGH se presenta predominantemente en forma de monómero, con una pequeña fracción en forma de dímeros y oligómeros de mayor peso molecular. Bajo determinadas condiciones, es posible inducir a la hGH para formar cantidades mayores de dímeros, trímeros y oligómeros superiores.

25 Se conocen diversos derivados de hGH, incluidos los derivados de origen natural, variantes y productos metabólicos, productos de degradación principalmente de hGH biosintética y derivados de hGH tratados por métodos de ingeniería genética. GH-V, una variante de la hormona del crecimiento hallada en la placenta, es un ejemplo de derivado de la hGH de origen natural. En Chen et al. (1989) se describen otros miembros del locus génico.

30 La metionil-hGH fue la primera forma de hGH producida por tecnología de ADN recombinante. Este compuesto es, en realidad, un derivado de hGH con un residuo adicional de metionina en su extremo N-terminal (Goeddel et al., 1979).

Se ha informado de que una variante de origen natural de hGH, llamada 20-K-hGH, aparece en la pituitaria así como en el torrente sanguíneo (Lewis et al., 1978; Lewis et al., 1980). Este compuesto, que carece de los 15 residuos aminoácidos desde Glu-32 a Gln-46, surge de un empalme alternativo del ácido ribonucleico mensajero (DeNoto et al., 1981). Este compuesto comparte numerosas, pero no todas las propiedades biológicas de hGH.

35 La 20-K-hGH se produce en la pituitaria y se libera a la sangre. Representa aproximadamente 5% de la producción de hormona del crecimiento del adulto y aproximadamente 20% de la producción de hormona del crecimiento en el niño. Posee la misma actividad promotora del crecimiento que la hormona del crecimiento de 22 kD, y se ha comunicado que su actividad lipolítica es igual o mayor que la de la hormona del crecimiento 22 kD. Se une a los receptores de hormona del crecimiento con la misma afinidad que la hormona del crecimiento 22 kD, y su bioactividad lactogénica (semejante a prolactina) es la décima parte de la correspondiente a la hormona 22 kD. A diferencia de la hormona 22 kD, la 20-k-hGH muestra una débil actividad anti-insulínica.

45 A partir de modificaciones proteolíticas de la molécula, han surgido numerosos derivados de hGH. La vía principal del metabolismo de hGH implica la proteólisis. La región de hGH alrededor de los residuos 130-150 es extremadamente susceptible a la proteólisis, y se han descrito varios derivados de hGH que tienen cortes y deleciones en esta región (Thorlacius-Ussing, 1987). Esta región se encuentra en el bucle grande de hGH y la escisión de un enlace peptídico en la misma da como resultado la generación de dos cadenas que están conectadas a través del enlace disulfuro en Cys-53 y Cys-165. Se informa de que muchas de estas formas constituidas por dos cadenas tienen una actividad biológica aumentada (Singh et al., 1974). Se han generado numerosos derivados de la hormona del crecimiento humana de manera artificial mediante el uso de enzimas. Se han empleado las enzimas tripsina y subtilisina, así como otras, para modificar la hGH en diversos puntos a lo largo de la molécula (Lewis et al., 1977; Graff et al., 1982). Uno de estos derivados, denominado proteína anabólica de dos cadenas (2-CAP), se formó por la proteólisis controlada de hGH usando tripsina (Becker et al., 1989). Se ha demostrado que la 2-CAP posee propiedades biológicas muy diferentes de las de la molécula intacta de hGH, en el sentido de que conserva en gran medida la activi-

dad promotora del crecimiento de hGH, en tanto que se ha abolido la mayor parte de los efectos sobre el metabolismo de carbohidratos.

Los residuos de asparagina y glutamina en las proteínas son susceptibles de experimentar reacciones de desamidación bajo condiciones apropiadas. Se ha demostrado que la hGH pituitaria sufre este tipo de reacción, dando como resultado la conversión de Asn-152 en ácido aspártico e, igualmente, aunque en menor grado, la conversión de Gln-137 en ácido glutámico (Lewis et al., 1981). Se ha comprobado que la hGH desamidada exhibe una susceptibilidad alterada a la proteólisis con la enzima subtilisina, lo que sugiere que la desamidación puede ser un factor fisiológico importante para dirigir la escisión proteolítica de hGH. Es sabido que la hGH biosintética se degrada bajo determinadas condiciones de conservación, con el resultado de una desamidación en una asparagina diferente (Asn-149). Este es el lugar principal de desamidación, pero también se ha registrado la desamidación en Asn-152 (Becker et al., 1988). En la hGH biosintética no se ha informado de desamidación en Gln-137.

Los residuos de metionina en las proteínas son susceptibles de oxidación, principalmente al sulfóxido. Tanto la hGH derivada de la pituitaria como la de origen biosintético experimentan sulfoxidaciones en Met-14 y Met-125 (Becker et al., 1988). Asimismo, se ha comunicado la oxidación en Met-170 en la hGH pituitaria, pero no en la biosintética. Se ha comprobado que tanto la hGH desamidada como la Met-14 sulfóxido hGH exhiben plena actividad biológica (Becker et al., 1988).

Se han producido formas truncadas de hGH, mediante la acción de enzimas o por métodos genéticos. En la 2-CAP, generada por la acción controlada de la tripsina, se eliminan los ocho primeros residuos del extremo N-terminal de la hGH. Se han producido otras versiones truncadas de hGH modificando el gen antes de la expresión en un hospedador apropiado. Se han eliminado los 13 primeros residuos para dar un derivado dotado de propiedades biológicas concretas (Gertier et al., 1986), en el que la cadena de polipéptidos no está escindida.

Aunque originalmente la hormona del crecimiento humana se obtuvo de las glándulas pituitarias de cadáveres, estas preparaciones no estaban homogeneizadas por electroforesis y en el suero de pacientes tratados con preparaciones con una pureza del orden de 50% aparecían anticuerpos, atribuyéndose la inmunogenicidad a componentes inactivos. La tecnología de ADN recombinante permitió la producción de una cantidad ilimitada de hGH en una serie de sistemas diferentes. La purificación de hGH a partir del medio de cultivo se ve facilitada por la presencia de cantidades escasas de proteínas contaminantes. De hecho, se ha demostrado que se puede purificar la hGH a escala de laboratorio mediante una única etapa de purificación en una columna de HPLC de fase reversa (Hsiung et al., 1989).

La compañía Serono International, S.A. produce hormona del crecimiento humana recombinante, rhGH, bajo el nombre SEROSTIM®, producto al que se ha concedido una aprobación acelerada de la FDA (Agencia de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.) para tratar la pérdida de peso y la caquexia en pacientes con SIDA. SAIZEN® es la hormona del crecimiento humana recombinante indicada en el déficit de GH en niños, en el síndrome de Turner en niñas, así como en la insuficiencia renal crónica infantil. PROTROPIN®, producida por Genentech, Inc. (San Francisco Sur, CA) muestra una estructura ligeramente diferente de la hGH de secuencia natural, al tener un residuo de metionina adicional en el extremo N-terminal. La hGH recombinante se comercializa generalmente como viales que contienen hGH más excipientes adicionales, por ejemplo, glicina y manitol, en forma liofilizada. Se ofrece un vial de diluyente adicional, que permite al paciente reconstituir el producto hasta la concentración deseada antes de la administración de la dosis. La hGH recombinante se puede comercializar también en otras formas bien conocidas tales como jeringas precargadas.

Para que la hGH pueda estar disponible en el comercio como preparado terapéutico es necesario producir formulaciones estables. Estas formulaciones deben ser capaces de conservar su actividad durante los periodos de almacenamiento adecuados y su administración por parte del paciente debe ser aceptable.

La GH humana ha sido formulada de muy diversas maneras. A modo de ejemplo, el documento US 5.096.885 describe una formulación estable y farmacéuticamente aceptable de hGH que comprende, además de hGH, glicina, manitol, una solución tampón y, opcionalmente, un tensioactivo no iónico, en la que la proporción molar de hGH:glicina es de 1:50.

El documento WO 93/19776 describe formulaciones inyectables de GH que comprenden citrato como sustancia tampón y, opcionalmente, factores de crecimiento tales como factores de crecimiento insulínicos o factor de crecimiento epidérmico, aminoácidos tales como glicina o alanina, manitol u otros polialcoholes, glicerol y/o un conservante tal como alcohol bencílico.

El documento WO 94/101398 describe una formulación de GH que comprende hGH, una sustancia tampón, un tensioactivo no iónico y, opcionalmente, manitol, una sal neutra y/o un conservante.

El documento EP-0131864 describe una solución acuosa de proteínas con un peso molecular mayor que 8500 Daltons, que están protegidas contra la adsorción en interfaces, contra la desnaturalización y contra la precipitación de la proteína por la adición de una sustancia tensioactiva que contiene una cadena lineal de polioxisilquileño como agente estabilizador.

El documento EP-0211601 describe una formulación estimulante del crecimiento que comprende una mezcla acuosa de hormona estimulante del crecimiento y un polímero de bloques que contiene unidades de polioxietileno-polioxipropileno, y que exhibe un peso molecular promedio de aproximadamente 1.100 hasta aproximadamente 40.000, que conserva la fluidez de la hormona estimulante del crecimiento y su actividad biológica tras la administración.

El documento WO 97/29767 describe una formulación líquida que comprende una hormona del crecimiento, citrato trisódico dihidratado, cloruro sódico, hidróxido sódico, alcohol bencílico, Pluronic F-68, en donde dicha formulación tiene un pH de 5,6.

El documento US 5.567.677 describe formulaciones líquidas que comprenden hormona del crecimiento humana, citrato sódico, fosfato sódico, glicina, manitol y, opcionalmente, alcohol bencílico.

Las preparaciones farmacéuticas de hGH tienden a ser inestables, especialmente en solución. Se producen especies degradadas químicamente tales como formas desamidadas o sulfoxiladas de hGH y, como consecuencia de la inestabilidad física, pueden aparecer especies agregadas dímeras o de mayor peso molecular (Becker et al., 1988; Becker et al., 1987; Pearlman y Nguyen, 1989).

Como consecuencia de la inestabilidad de la hGH en solución, las formulaciones farmacéuticas de hGH se encuentran generalmente en forma liofilizada que, entonces, deben ser reconstituidas antes de su uso. Habitualmente, la reconstitución se lleva a cabo por la adición de un diluyente farmacéuticamente aceptable tal como agua para inyección estéril, suero salino fisiológico estéril o un diluyente estéril, fisiológicamente aceptable y adecuado.

Las soluciones reconstituidas de hGH se conservan preferentemente a 4°C para minimizar las reacciones químicas y físicas de degradación; no obstante, durante este periodo de almacenamiento, que puede ser de hasta 14 días, se producirá una cierta degradación.

Sería especialmente ventajosa una formulación farmacéutica de hGH ofrecida en forma líquida, en particular una capaz de mantener la estabilidad de hGH sin que se produzca precipitación, agregación ni ninguna otra materia particulada durante un periodo de tiempo prolongado.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar formulaciones líquidas de hormona del crecimiento que no den como resultado la formación de materia particulada indeseable, y que muestren un periodo de almacenamiento prolongado.

RESUMEN DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la invención se refiere a una formulación líquida que comprende:

- a) una hormona del crecimiento, o una hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH, por sus siglas en inglés);
- b) una sal de metal alcalino;
- c) una sal de metal alcalino-térreo, o una sal de metal pseudo-alcalino-térreo; y
- d) una solución tampón de citrato/fosfato, en donde el pH de la formulación está dentro del intervalo de 5,5 a 5,8.

Un segundo aspecto de la invención hace referencia a un procedimiento para preparar la formulación líquida según la presente invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una formulación liofilizada que se reconstituye de manera que se obtenga la nueva formulación líquida mencionada anteriormente.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere al uso de una formulación según la invención para la administración como monodosis o multidoses de una hormona del crecimiento.

Un quinto aspecto de la invención hace referencia a una forma de presentación de la formulación líquida según la invención.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, se ha observado que es posible incrementar la estabilidad química y física de una hormona del crecimiento en una formulación líquida mediante la selección específica de sales minerales. De esta forma, las soluciones obtenidas se pueden conservar durante un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, durante aproximadamente 1 a 52 semanas, o 1 a 16, o 1 a 4 semanas, preferentemente a temperatura ambiente.

Adicionalmente, se ha encontrado que es posible obtener una estabilidad aumentada de la hormona del crecimiento en una formulación líquida, durante un periodo de tiempo prolongado, con una composición según la reivindicación 1.

Por consiguiente, la invención se refiere a una formulación líquida que comprende:

- 5 a) una hormona del crecimiento, o una hormona liberadora de la hormona del crecimiento;
- b) una sal de metal alcalino;
- c) una sal de metal alcalino-térreo, o una sal de metal pseudo-alcalino-térreo; y
- d) una solución tampón de citrato/fosfato, en donde el pH de la formulación está dentro del intervalo de 5,5 a 5,8.

10 En una forma de realización, las formulaciones líquidas de la presente invención se pueden utilizar para la administración multidosis, en donde dichas formulaciones se pueden conservar a temperatura ambiente durante un periodo de 1 semana o superior.

La hormona del crecimiento que se puede formular según la presente invención puede proceder de cualquier especie tal como bovina, porcina, canina o felina, dependiendo del uso previsto para la formulación.

Preferentemente, se pueden formular las siguientes sustancias según la presente invención:

- 15 a) hormona del crecimiento humana;
- b) un fragmento de (a) que posee actividad agonista sobre el receptor de hGH;
- c) una variante de (a) o (b) que exhibe una identidad de secuencia de al menos 70% con (a) o (b), y que posee actividad agonista sobre el receptor de hGH;
- 20 d) una variante de (a) o (b) que está codificada por una secuencia de ADN que se hibride con el complemento de la secuencia nativa de ADN que codifica (a) o (b) bajo condiciones moderadamente rigurosas, y que posee actividad agonista sobre el receptor de hGH; o
- e) una sal o un derivado funcional de (a), (b), (c) o (d), que posee actividad agonista sobre el receptor de hGH.

De acuerdo con la presente invención, se prefiere una formulación que comprende una hormona del crecimiento humana.

25 La expresión "hormona del crecimiento humana" o "hGH", tal como se usa en la presente invención, pretende incluir los derivados de origen natural y sintético, como se ha indicado anteriormente, incluyendo, sin limitaciones, tanto la hormona del crecimiento humana de 20 kD como de 22 kD, la GH-V y otros miembros del locus génico de la hormona del crecimiento, tal como se ha descrito en "Antecedentes de la invención".

30 La hGH puede ser hormona del crecimiento humana de origen natural o, preferentemente, puede ser hGH recombinante. La GH recombinante se puede expresar en cualquier hospedador adecuado, ya sea un hospedador procariótico o eucariótico. Por ejemplo, *E. coli* es un hospedador especialmente apropiado para la expresión de hGH. Adicionalmente, las células de levadura, insectos o mamíferos son apropiadas para la expresión de la hormona del crecimiento recombinante. Preferentemente, la hGH se expresa en células humanas o animales, por ejemplo, en células de Ovario del Hámster Chino (CHO, por sus siglas en inglés).

35 Las expresiones "hGH" u "hormona del crecimiento", tal como se usan en este documento, incluyen también derivados funcionales, fragmentos, variantes, análogos, o sales que conservan la actividad biológica de la hormona del crecimiento, es decir, que actúan como agonistas sobre el receptor de la hormona del crecimiento. En otras palabras, tienen la capacidad de unirse al receptor de la hormona del crecimiento para iniciar la actividad de señalización del receptor.

40 Las expresiones "derivados funcionales", o "derivados químicos", tal como se usan en este documento, abarcan derivados que pueden estar preparados a partir de los grupos funcionales que se detectan como cadenas laterales en los residuos de los grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención en tanto en cuanto continúen siendo farmacéuticamente aceptables y no destruyan la actividad biológica de la hGH que se ha descrito en este documento, es decir, la capacidad para unirse al receptor de hGH e iniciar la señalización del receptor, ni confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen. Los derivados pueden tener restos químicos tales como residuos de carbohidrato o fosfato, con la condición de que dicho derivado conserve la actividad biológica de la hGH y continúe siendo farmacéuticamente aceptable.

Por ejemplo, los derivados pueden incluir ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acilo o grupos de aminoácidos libres de los residuos aminoácidos con restos acilo (por ejemplo, grupos alcanilo o aroilo carbocíclicos), o derivados O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de los residuos de serilo o treonilo) formados con restos acilo. Estos derivados pueden incluir también, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol que pueden enmascarar sitios antigénicos y prolongar la permanencia de la molécula en fluidos corporales.

Una hormona del crecimiento que haya sido derivatizada o combinada con un agente complejante puede ser de duración prolongada. Por lo tanto, una forma de realización preferida de la invención hace referencia a versiones PEGiladas de hormona del crecimiento humana. Las hormonas del crecimiento tratadas por ingeniería genética para exhibir una actividad de larga duración en el organismo son ejemplos, también, de derivados de hGH dentro del alcance de la presente invención.

Se ha aislado e identificado una hGH que está acetilada en el extremo N-terminal (Lewis et al., 1979). No está claro si la acilación desempeña algún papel regulador o si se trata simplemente de un artefacto de la purificación. Cabe esperar, sin embargo, que esta molécula exhiba actividad GH de manera similar a otros derivados de hGH. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la invención se refiere a hormona del crecimiento humana que está acetilada en su extremo N-terminal.

Preferentemente, la formulación según la invención comprende un dímero de hormona del crecimiento humana seleccionado del grupo consistente en un dímero disulfuro conectado por medio de enlaces disulfuro entre cadenas, un dímero no disulfuro irreversible y covalente, un dímero no covalente, y mezclas de los mismos.

El término "sales" en este documento hace referencia tanto a sales de grupos carboxilo como a sales por adición de ácido de grupos amino de la molécula de hGH o análogos de la misma. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, hierro o cinc y similares, y sales con bases orgánicas tales como las formadas, por ejemplo, con aminas tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales por adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Evidentemente, cualquiera de estas sales debe conservar la actividad biológica de hGH relevante para la presente invención, es decir, la estabilidad de la unión al receptor de hGH, e inicio de la señalización del receptor.

En una forma de realización preferida adicional, la invención hace referencia a un fragmento de hormona del crecimiento humana.

Un "fragmento" de la hormona del crecimiento humana según la presente invención se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido de menor longitud, que conserve la actividad biológica deseada. Los fragmentos se pueden preparar fácilmente eliminando aminoácidos de cualquiera de los extremos de la molécula de hGH y analizando las propiedades del elemento resultante como agonista del receptor de hGH. Se conocen proteasas para eliminar un aminoácido en cada etapa del extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido y, por consiguiente, la determinación de fragmentos que conservan la actividad biológica deseada implica únicamente métodos rutinarios de experimentación.

Preferentemente, los fragmentos de hGH según la presente invención pueden tener delecciones internas, con la condición de que la delección no afecte a la actividad biológica de hGH, es decir, su unión e iniciación de la señalización a través del receptor de hGH. Un fragmento preferido según la invención carece de 15 aminoácidos desde el ácido glutámico (Glu) 32 hasta el ácido glutámico 46.

Adicionalmente, los fragmentos de hGH pueden estar truncados en el extremo C- o N-terminal. De acuerdo con la presente invención, se prefiere también una hGH truncada que carece de los ocho primeros residuos N-terminales o de los 13 primeros residuos N-terminales de la hormona del crecimiento humana.

Se ha descrito que un fragmento corto C-terminal de hGH conserva la actividad biológica de hGH, véase el documento US 5.869.452. Por lo tanto, según la presente invención, se prefiere el uso de un fragmento C-terminal de hGH. De forma particular, se prefiere según la presente invención el fragmento hGH177-191, que comprende al menos los residuos aminoácidos 177 a 191 de hGH (LRIVQCRSVEGSCGF). Se prefieren, adicionalmente, los derivados de este péptido tales como las variantes peptídicas descritas en los documentos US 6.335.319 o WO 99/12969, por ejemplo, péptidos cíclicos.

Adicionalmente, el polipéptido que exhibe esta actividad agonista sobre el receptor de hGH, ya sea hGH, un análogo o variante, sal, derivado funcional o fragmento del mismo, puede contener también residuos aminoácidos adicionales flanqueando el polipéptido de hGH. Con la condición de que la molécula resultante conserve la capacidad agonista sobre el receptor de hGH en el polipéptido central, se puede determinar por experimentación rutinaria si cualquiera de los residuos que lo flanquean afecta a las características básicas y novedosas del polipéptido central, es decir, sus características agonistas sobre el receptor.

Un ejemplo de dicha variante de GH, que se prefiere de acuerdo con la presente invención, es la metionil hormona del crecimiento humana (Met-hGH), que posee un residuo adicional de metionina en el extremo N-terminal de la hormona del crecimiento humana.

5 Las variantes de hGH preferidas según la invención comprenden metionil hGH, que es una hormona del crecimiento humana que tiene un residuo adicional de metionina en su extremo N-terminal. Otra variante preferida es una hormona del crecimiento humana que carece de 15 residuos aminoácidos desde Glu32 a Glu46.

10 Una "variante" de la hormona del crecimiento humana según la presente invención hace referencia a una molécula que, sustancialmente, es similar a la proteína entera o a un fragmento de la misma. La variante puede recibir también el nombre de "muteína". Por ejemplo, una variante puede ser una isoforma de hGH tal como una variante generada por empalme (*splicing*) alternativo. También se pueden preparar, de manera ventajosa, (poli)péptidos variantes por síntesis química directa del péptido variante, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por supuesto, una hormona del crecimiento humana variante tendría al menos una actividad de unión e inicio de señalización sobre el receptor de hGH similar a la de hGH y, por consiguiente, cabría esperar que tuviera una actividad similar a la de hGH.

15 Se pueden preparar otras variantes de la secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento humana por mutaciones en los ADN responsables de la codificación de los derivados de la hormona del crecimiento humana. Estas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones de residuos en la secuencia de aminoácidos. También se puede llevar a cabo cualquier combinación de deleciones, inserciones y sustituciones para alcanzar la construcción final, con la condición de que ésta posea la actividad deseada. Evidentemente, las mutaciones que se realizarán en el ADN que codifica el péptido variante no deben alterar el marco de lectura.

20 A nivel genético, estas variantes se pueden preparar por mutagénesis de sitio dirigido (según el ejemplo propuesto por Adelman et al., 1983) de nucleótidos en el ADN que codifica la molécula peptídica, produciendo de este modo ADN que codifica la variante y expresando, a continuación, el ADN en cultivo celular recombinante. Las variantes exhiben típicamente al menos la misma actividad biológica cualitativa que el péptido no-variante.

25 De acuerdo con la presente invención, un "análogo" de hormona del crecimiento humana hace referencia a una molécula no natural que es sustancialmente similar a la molécula completa o a un fragmento activo de la misma. Un análogo de hormona del crecimiento humana útil en la presente invención exhibiría actividad GH.

30 Los tipos de sustitución que se pueden llevar a cabo en la hormona del crecimiento humana según la presente invención pueden basarse en análisis de las frecuencias de variaciones de los aminoácidos entre una proteína homóloga de diferentes especies. Basándose en análisis de esta clase, las sustituciones conservadoras se pueden definir en este documento como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes:

I. Residuos pequeños, alifáticos, no polares o ligeramente polares:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly

II. Residuos polares con carga negativa y sus amidas:

35 Asp, Asn, Glu, Gln

III. Residuos polares con carga positiva:

His, Arg, Lys

IV. Residuos grandes, alifáticos, no polares:

Mel, Leu, Ile, Val, Cys

40 V. Residuos aromáticos grandes:

Phe, Try, Trp.

Dentro de los grupos anteriores, se considera que las siguientes sustituciones son "altamente conservadoras":

Asp/Glu

His/Arg/Lys

45 Phe/Tyr/Trp

Met/Leu/Ile/Val

Como sustituciones semi-conservadoras se definen los intercambios entre dos de los grupos (I)-(IV) anteriores, limitadas al supergrupo (A), que comprende los grupos (I), (II) y (III) anteriores, o al supergrupo (B), que comprende los grupos (IV) y (V) anteriores. Las sustituciones no se limitan a los aminoácidos genéticamente codificados ni siquiera a los aminoácidos de origen natural. Cuando el epítipo ha sido preparado por síntesis peptídica, se puede utilizar directamente el aminoácido deseado. De manera alternativa, es posible modificar un aminoácido genéticamente codificado haciéndolo reaccionar con un agente de derivatización orgánico capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales.

De forma muy frecuente, los residuos cisteinilo se hacen reaccionar con alfa-haloacetatos (y las aminas correspondientes) tales como ácido cloroacético o cloroacetamida para dar derivados carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilo se derivatizan también por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil-2-piridilo, p-cloro-mercuribenzoato, 2-cloromercuro-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenceno-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos de histidilo se derivatizan por reacción con pirocarbonato dietílico a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. También resulta útil el bromuro de para-bromofenacilo; la reacción se lleva a cabo, preferentemente, en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

Los residuos de lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídrido de ácido succínico u otro ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene como efecto invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos apropiados para derivatizar residuos que contienen alfa-aminoácidos incluyen imidoésteres tales como picolinimidato metílico; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitro-bencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y la reacción con glioxilato catalizada con transaminasa.

Los residuos de arginilo se modifican por reacción con uno o múltiples reactivos convencionales, entre los que se cuentan fenilgloxal; 2,3-butanodiona; y ninhidrina. La derivatización de los residuos de arginina requiere que la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas debido al alto valor del pKa del grupo funcional guanidina. Adicionalmente, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como el grupo épsilon-amino de arginina.

La modificación específica de los residuos de tirosilo *per se* ha sido estudiada exhaustivamente, con el interés particular de introducir marcadores espectrales en los residuos de tirosilo por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Muy a menudo, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de épsilon-nitro, respectivamente.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidas (R'-N-C-N-R') tales como 1-ciclohexil-3-[2-morfolinil-(4-etil)]-carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Adicionalmente, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio.

Los residuos de glutaminilo y asparaginilo se someten frecuentemente a desamidación para dar los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo. Alternativamente, estos residuos se desamidan bajo condiciones ligeramente ácidas. Cualquier forma de estos residuos se incluye en el alcance de esta invención.

Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden utilizar para obtener análogos de la hGH que se utilizan en la presente invención incluyen cualquier etapa de método tal como se expone en las patentes de EE.UU. RE 33.653; 4.959.314; 4.588.585 y 4.737.462, concedidas a Mark et al.; 5.116.943 a Koths et al.; 4.965.195 a Namen et al.; y 5.017.691 a Lee et al.; y las proteínas sustituidas con lisina que se describen en la patente de EE.UU. 4.904.584 (Shaw et al.). Se han descrito variantes adicionales de hormona del crecimiento, por ejemplo, en el documento US 6.143.523 (Cunningham et al.).

Entre las sustancias que se unen e inician la señalización del receptor de la hormona del crecimiento humana, que se pueden usar de acuerdo con la presente invención, se encuentran todos estos análogos y miméticos de hormona del crecimiento ya conocidos en la bibliografía tales como, por ejemplo, los que se describen en las patentes de EE.UU. 5.851.992; 5.849.704; 5.849.700; 5.849.535; 5.843.453; 5.834.598; 5.688.666; 5.654.010; 5.635.604; 5.633.352; 5.597.709; y 5.534.617.

Preferentemente, esta variante o análogo de hGH tendrá una secuencia central, que es la misma que la de la secuencia nativa o un fragmento biológicamente activo de la misma, que posee una secuencia de aminoácidos que exhibe una identidad de al menos 70% con la secuencia de aminoácidos nativa, y conserva la actividad biológica de la misma. Más preferentemente, la secuencia de este tipo tiene una identidad de al menos 80%, una identidad de al menos 90% o, de forma especialmente preferida, una identidad de al menos 95% con la secuencia nativa.

El término "identidad" refleja una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada por la comparación de secuencias. En general, identidad se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido en las dos secuencias de polinucleótidos o dos polipéptidos, respectivamente, a lo largo de las secuencias que se comparan.

Para las secuencias en las que no existe una correspondencia exacta, se puede determinar un “porcentaje de identidad”. En general, las dos secuencias que se comparan se encuentran alineadas para ofrecer una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de “gaps” (*huecos*) en alguna o en ambas secuencias, para potenciar el grado de alineamiento. Es posible determinar un porcentaje de identidad a lo largo de toda la longitud de cada una de las secuencias que se comparan (denominado alineamiento global), que es particularmente adecuado para secuencias de longitud idéntica o muy similar, o en longitudes menores definidas (denominado alineamiento local), que resulta más apropiado para secuencias de longitud desigual.

Los métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. De esta forma, por ejemplo, se pueden utilizar programas disponibles en el Paquete de Análisis Secuencial Wisconsin, versión 9.1 (Devereux J. et al., 1984), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, para determinar el porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos, y el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología entre dos secuencias de polipéptidos. BESTFIT utiliza el algoritmo de “homología local” de Smith y Waterman (1981) y detecta la mejor región única de similitud entre las secuencias. En la técnica se conocen también otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias, por ejemplo, la familia de programas BLAST (Altschul S.F. et al., 1990, Altschul S.F. et al., 1997, accesibles a través de la página principal del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W.R., 1990; Pearson, 1988).

Los cambios preferidos para las variantes o muteínas según la presente invención son los conocidos como sustituciones “conservadoras”. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de los polipéptidos o proteínas de la hormona del crecimiento pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que posee propiedades físico-químicas suficientemente similares, que garanticen que la sustitución entre miembros del grupo mantendrá la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Es evidente que se pueden llevar a cabo inserciones y deleciones de aminoácidos en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, en especial si las inserciones o deleciones afectan sólo a pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta y, preferentemente, menos de diez, o no eliminan o desplazan aminoácidos que resultan críticos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales deleciones y/o inserciones entran dentro del ámbito de la presente invención.

Los análogos o variantes según la presente invención también se pueden determinar de acuerdo con el procedimiento siguiente. Por la técnica anterior, el ADN de la secuencia nativa es conocido y está disponible en la bibliografía (Martial et al., 1979). Los polipéptidos codificados por cualquier ácido nucleico tal como ADN o ARN, que se hibridan con el complemento del ADN o ARN nativo bajo condiciones altamente rigurosas o moderadamente rigurosas, con la condición de que el polipéptido conserve la actividad biológica de la secuencia nativa, también se consideran incluidos dentro del alcance de la presente invención.

Las condiciones de rigurosidad son una función de la temperatura usada en el experimento de hibridación, la molaridad de los cationes monovalentes y el porcentaje de formamida en la solución de hibridación. Para determinar el grado de rigurosidad que implica cada conjunto de condiciones, se utiliza en primer lugar la ecuación de Meinkoth et al. (1984) para determinar la estabilidad de híbridos con 100% de identidad, expresada como temperatura de fusión T_m del híbrido ADN-ADN.

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ formamida}) - 500/L$$

en donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de nucleótidos G y C en el ADN, % formamida es el porcentaje de formamida presente en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. Por cada 1°C que se reduce la T_m con respecto a la calculada para un híbrido con una identidad de 100%, aumenta la cantidad de disparidad permitida en aproximadamente 1%. De este modo, si la T_m usada para cualquier experimento de hibridación determinado a las concentraciones de sal y formamida especificadas es 10°C inferior a la T_m calculada para un híbrido de 100%, según la ecuación de Meinkoth, se producirá hibridación incluso en presencia de una disparidad de hasta aproximadamente 10%.

Como se usa en este documento, condiciones altamente rigurosas son aquellas que toleran una divergencia de secuencia de hasta aproximadamente 15%, en tanto que condiciones moderadamente rigurosas son las que toleran una divergencia de secuencia de hasta aproximadamente 20%. Sin limitaciones, los ejemplos de condiciones altamente rigurosas (12 a 15°C por debajo de la T_m calculada del híbrido) y moderadamente rigurosas (15 a 20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido) utilizan una solución de lavado de 2 X SSC (citrate salino estándar, por sus siglas en inglés) y 0,5% de SDS a una temperatura aproximada menor que la T_m calculada del híbrido. La rigurosidad última de las condiciones se debe principalmente a las condiciones de lavado, en especial si las condiciones de hibridación usadas son las que permiten la formación de híbridos menos estables junto con híbridos estables. Las condiciones de lavado con mayor rigurosidad eliminan, entonces, los híbridos menos estables. Una condición de hibridación común, que se puede usar con las condiciones de lavado altamente rigurosas a moderadamente rigurosas descritas anteriormente, comprende la hibridación en una solución de 6 X SSC (o 6 X SSPE), 5 X reactivo de Denhardt, 0,5% de SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de esperma desnaturalizado y fragmentado de salmón, a una tempera-

tura aproximadamente 20° a 25°C por debajo de la Tm. Si se emplean sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametil-amonio (TMAC) en lugar de SSC (Ausubel, 1987-1998).

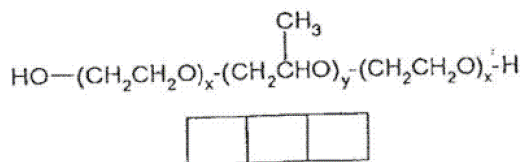
5 Mientras que la presente invención proporciona métodos recombinantes para preparar derivados de la hormona del crecimiento humana, estos derivados también se pueden preparar mediante métodos de síntesis convencional de proteínas, bien conocidos por los expertos en la técnica.

La formulación de la invención comprende polietilen-polipropilenglicol. Este polímero es un tensioactivo no iónico. En este documento, un tensioactivo puede ser designado también como "agente tensioactivo". En una forma de realización todavía más preferida, la formulación comprende el polietilen-polipropilenglicol en una concentración en el intervalo de 0,5 a 5 mg/ml, o 1 a 2 mg/ml, o 1,5 mg/ml.

10 En una formulación preferida, el tensioactivo es un polioli plurónico tal como, por ejemplo, F68. De acuerdo con la presente invención, se prefiere en particular Pluronic F68.

Al formular la GH con el tensioactivo Pluronic® F68 (BASF, conocido también como Poloxamer 188) se obtuvo una formulación estable que evita el problema de la precipitación, agregación o generación de materia particulada de cualquier tipo.

15 Pluronic F68 es un copolímero en bloques de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO). El bloque de óxido de propileno (PO) se encuentra situado entre dos bloques de óxido de etileno (EO).



Se crea un hidrófobo del peso molecular deseado mediante la adición controlada de óxido de propileno a los dos grupos hidroxilo de propilenglicol; y

20 Se agrega óxido de etileno para recubrir el hidrófobo a modo de sándwich entre los grupos hidrófilos.

En Pluronic F69, el porcentaje de polioxietileno (hidrófilo) es de 80%, y el peso molecular del hidrófobo (polioxipropileno) es de aproximadamente 1967 Da.

A continuación, se enumeran las propiedades típicas de Pluronic F68:

Peso molecular promedio: 8.400;

25 Punto de fusión/fluidez: 52°C;

Forma física a 20°C: sólida;

Viscosidad (Brookfield) cps: 1000 [líquidos a 25°C; pastas a 60°C y sólidos a 77°C]

Tensión superficial, dinas/cm a 25°C;

Conc. 0,1%: 50,3

30 Conc. 0,01%: 51,2

Conc. 0,001%: 53,6

Tensión interfacial, dinas/cm a 25°C frente a Nujol;

Conc. 0,1%: 19,8

Conc. 0,01%: 24,0

35 Conc. 0,001%: 26,0

Humectación de Draves, segundos a 25°C;

- Conc. 1,0%: >360
- Conc. 0,1%: >360
- Altura de la espuma
- Ross Miles, 0,1%, mm a 50°C: 35
- 5 Ross Miles, 0,1%, mm a 26°C: 40
- Dynamic, 0,1%, mm a 400 ml/min: >600
- Punto de nube en solución acuosa, °C:
- Conc. 1%: >100
- Conc. 10%: >100
- 10 HLB (balance hidrófilo-lipófilo): 29
- En las formulaciones de la invención, se pueden utilizar otros polímeros que tengan propiedades similares a las de Pluronic F68.
- El polietilen-polipropilenglicol se puede emplear en una concentración en el intervalo de 0,5 a 5 mg/ml, o 1 a 2 mg/ml, o 1,5 mg/ml.
- 15 El experto en la técnica podrá observar que se pueden utilizar uno o múltiples tensioactivos adicionales, además del polietilen-polipropilenglicol.
- La formulación de la invención comprende, adicionalmente, un agente estabilizador. El agente estabilizador puede actuar también como agente isotónico.
- 20 Un "agente isotónico" es un compuesto fisiológicamente tolerado que imparte una tonicidad adecuada a una formulación para evitar el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación. Compuestos tales como glicerina se utilizan habitualmente para estos fines a concentraciones conocidas. Otros agentes estabilizadores adecuados incluyen, sin limitaciones, aminoácidos o proteínas (por ejemplo, glicina o albúmina), sales (por ejemplo, cloruro sódico), y azúcares (por ejemplo, dextrosa, sacarosa y lactosa).
- 25 Agentes estabilizadores (estabilizadores) o isotónicos que se pueden utilizar preferentemente según la presente invención incluyen azúcares no reductores, incluidas sacarosa, trehalosa, sorbosa, melezitosa y rafinosa; manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol.
- En una forma de realización preferida, el estabilizador o agente isotónico es sacarosa.
- En una forma de realización preferida adicional, la formulación contiene sacarosa en una concentración en el intervalo de 10 mg/ml a 100 mg/ml, o 20 mg/ml a 80 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml.
- 30 Las formulaciones según la presente invención contienen una sal de metal alcalino, incluidos NaCl, KCl, Na₂SO₄, Na₂CO₃. En una forma de realización preferida, la sal de metal alcalino es NaCl o Na₂SO₄.
- Las formulaciones según la presente invención contienen, adicionalmente, una sal de metal alcalino-térreo, incluidos CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, NH₄CO₃. En una forma de realización preferida, la sal alcalino-térrea es MgCl₂.
- 35 Las formulaciones según la invención comprenden, adicionalmente, una solución tampón de citrato/fosfato. Una solución tampón de citrato/fosfato que se puede utilizar en la presente invención puede ser, por ejemplo, una solución tampón de citrato sódico/fosfato sódico.
- La expresión "solución tampón" o "solución tampón fisiológicamente aceptable" hace referencia a soluciones de compuestos que son reconocidamente seguros para uso en formulaciones farmacéuticas o veterinarias y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación dentro del intervalo de pH deseado para la misma.
- 40 Es preferible que las formulaciones de la presente invención comprendan citrato/fosfato en una concentración en el intervalo de 1 a 100 mM, o de 5 a 50 mM, o de 10 a 20 mM.
- Las formulaciones de la invención son líquidas y comprenden, por lo tanto, un diluyente acuoso.

La expresión “diluyente acuoso” se refiere a un disolvente líquido que contiene agua. Los sistemas disolventes acuosos pueden consistir exclusivamente en agua, o pueden consistir en agua y uno o múltiples disolventes miscibles, y pueden contener solutos disueltos tales como azúcares, soluciones tampón, sales u otros excipientes.

5 Del mismo modo, la formulación puede comprender también uno o múltiples disolventes no acuosos. Disolventes no acuosos utilizados frecuentemente son los alcoholes orgánicos de cadena corta tales como metanol, etanol, propanol, cetonas de cadena corta tales como acetona, y polialcoholes tales como glicerol.

La formulación de la invención comprende, preferentemente, además un conservante. La adición de un conservante es especialmente preferida si está previsto utilizar la hormona del crecimiento para la administración multidosis.

10 Un “conservante” es un compuesto que se puede incluir en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en la misma, facilitando de esta forma la producción, por ejemplo, de una formulación multidosis. Ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecil-dimetil-bencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencil-dimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil-parabenos tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol.

15 En este documento, un conservante puede ser un bacteriostático. El término “bacteriostático” hace referencia a un compuesto o composiciones agregadas a una formulación para actuar como agente antibacteriano. Una formulación que contiene GH y un conservante según la presente invención cumple, preferentemente, las directrices legales o reguladoras relativas a la eficacia del conservante para ser un producto multiuso (multidosis) comercialmente viable. Ejemplos de bacteriostáticos incluyen fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquil-parabeno (metil, etil, propil, butil y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, dehidroacetato sódico y timerosal.

20 Preferentemente, el conservante está presente en una concentración en el intervalo de 1 a 10 mg/ml, o 2 a 5 mg/ml, o 3 mg/ml.

25 El conservante preferido de la invención es fenol.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de la formulación líquida, que comprende la etapa de preparar una solución acuosa de los componentes de la formulación, de acuerdo con la presente invención.

30 La invención se refiere, además, a un procedimiento para la producción de la formulación líquida, que comprende la etapa de disponer una cantidad predeterminada de la formulación en un recipiente estéril. Típicamente, esta cantidad es del orden de mililitros.

35 Las formulaciones líquidas de hGH para administración terapéutica se pueden preparar también combinando hGH y agentes estabilizadores, con el grado de pureza deseado, con excipientes, soluciones tampón o conservantes fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición, Osoll A. Ed (1980). Excipientes aceptables son aquellos que carecen de toxicidad para el paciente a las concentraciones y dosificaciones usadas, e incluyen, por ejemplo, soluciones tampón, conservantes, antioxidantes, modificadores de pH y tonicidad.

40 La formulación líquida de hormona del crecimiento puede incluir también, si se desea, uno o múltiples excipientes estabilizadores. Excipientes estabilizadores adicionales pueden incluir, por ejemplo, aminoácidos tales como glicina o alanina, manitol u otros polialcoholes, o glicerol. Además, la formulación líquida puede incluir otros factores de crecimiento tales como factores de crecimiento insulínicos (IGF, por sus siglas en inglés) o proteínas que se unen a los IGF.

La estabilidad incrementada de la hGH ofrecida por las formulaciones preparadas según la presente invención permite un uso más extenso de formulaciones de hGH, que pueden ser más concentradas que las utilizadas habitualmente.

45 El término “estabilidad” hace referencia a la estabilidad física, química y conformacional de formulaciones de hormona del crecimiento de la presente invención (incluido el mantenimiento de la potencia biológica). La inestabilidad de una formulación de proteína puede deberse a la degradación química o agregación de las moléculas de proteína para formar estructuras de un orden superior por deglicosilación, modificación de la glicosilación, desamidación, oxidación o cualquier otra modificación estructural que reduzca al menos una actividad biológica de un polipéptido de GH incluido en la presente invención.

50 En la técnica se conocen auto-inyectores tales como el denominado Easyject®, que resulta especialmente útil para la administración de hGH. Igualmente, en conexión con la presente invención se puede emplear la administración sin aguja, usando dispositivos especiales conocidos en la técnica.

- Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la formulación de la invención. Composiciones dentro del alcance de esta invención incluyen todas las composiciones que comprenden al menos una hormona del crecimiento humana o un derivado, análogo o variante de la misma según la presente invención, en una cantidad efectiva para producir su acción prevista. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de cantidades efectivas de cada componente se lleva a cabo por medio de la experiencia adquirida en la técnica. Las dosificaciones típicas comprenden aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal al día. Cuando se administra a un paciente, la terapia de hGH se puede administrar simultáneamente con otras terapias que puedan estar indicadas en esta enfermedad.
- La formulación líquida de la presente invención se puede obtener tras la reconstitución de una muestra liofilizada de Hormona del Crecimiento con un diluyente apropiado (por ejemplo, agua para inyección), de manera que la formulación contiene los excipientes identificados anteriormente.
- El término “administrar” significa introducir en el organismo de un paciente que la requiere una formulación de la presente invención, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno.
- En una forma de realización preferida de la invención, la hGH se administra en una dosificación diaria de aproximadamente 0,1 a 10 mg, o aproximadamente 0,5 a 6 mg. En una forma de realización, la dosificación diaria es de aproximadamente 0,15 a 0,3 mg de hGH al día, preferentemente por inyección subcutánea. En una forma de realización adicional, se administra una dosificación de aproximadamente 1 mg de hormona del crecimiento humana al día a un paciente que la necesita.
- En una forma de realización adicional, la hGH se administra en dosificaciones alternas, en donde la primera dosificación es mayor que la segunda. Preferentemente, la primera dosificación es de aproximadamente 1 mg y la segunda es de aproximadamente 0,5 mg. Las dosificaciones semanales son preferentemente de aproximadamente 6 mg, o aproximadamente 5 mg, o aproximadamente 4,5 mg, dependiendo de las necesidades del paciente.
- El término “paciente” significa un mamífero en el que se trata una enfermedad o trastorno. Los pacientes son, sin limitaciones, de los siguientes orígenes: humano, ovino, porcino, equino, bovino, conejo y similares.
- La formulación de la presente invención es apropiada para muchos regímenes de administración diferentes. Por ejemplo, la administración puede ser por vías parenteral tal como subcutánea, intravenosa, intramuscular, oral, intraperitoneal, en aerosol, transdérmica, intratecal o rectal. La dosificación administrada depende de la edad, estado de salud y peso del receptor, tipo de tratamiento anterior o concomitante, si lo hay, frecuencia del tratamiento y naturaleza del efecto deseado.
- De acuerdo con la presente invención, se prefieren las vías de administración subcutánea e intramuscular.
- Se entiende que la dosis apropiada de una composición o formulación según la presente invención dependerá de la edad, estado de salud y peso del receptor, tipo de tratamiento simultáneo, si lo hay, frecuencia del tratamiento, y naturaleza del efecto deseado. Sin embargo, la dosificación más especialmente preferida se puede diseñar a medida del sujeto individual, tal como lo entenderá y determinará el experto en la técnica, sin necesidad de experimentaciones indebidas. Esto implica, típicamente, el ajuste de una dosis estándar, por ejemplo, la reducción de la dosis si el paciente presenta peso corporal bajo.
- La dosis total requerida para cada tratamiento se puede administrar en dosis múltiples (multidosis) o en una única dosis (“monodosis”).
- La expresión “uso multidosis” pretende incluir el uso de un único vial, ampolla o cartucho de formulación de GH para más de una inyección, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más inyecciones. Las inyecciones pueden estar separadas en el tiempo, por ejemplo, por un periodo de 6, 12, 24, 48 o 72 horas.
- La invención se refiere, además, al uso de una formulación según la presente invención para la administración monodosis. En un aspecto alternativo, la invención se refiere al uso de una formulación según la presente invención para la administración multidosis.
- Las formulaciones multidosis típicas de hGH de la compañía Serono (Saizen) contienen 1,33, 3,33 u 8 mg de hGH.
- Las formulaciones multidosis típicas de hGH de la compañía Lilly (Humatrope) contienen 6, 12 o 24 mg de hGH.
- Las formulaciones multidosis típicas de hGH de la compañía Pfizer (Genotropin) contienen 5 o 12 mg de hGH.
- Las formulaciones multidosis típicas de hGH de la compañía Novo Nordisk (Genotropin) contienen 5, 10 o 15 mg de hGH.
- De esta forma, en las formulaciones típicas de hGH, la cantidad ofrecida por vial es de 1,33, 3,33, 5, 6, 8, 10, 12, 15 o 24 mg.

Las composiciones se pueden administrar solas o junto con otros productos terapéuticos dirigidos contra la enfermedad o dirigidos contra otros síntomas de la misma.

Las formulaciones de hGH de la presente invención pueden dispensarse en viales.

5 El término "vial" se refiere, en general, a un recipiente adecuado para conservar la GH en forma sólida o líquida en condiciones de esterilidad. Ejemplos de viales, como se utilizan en este documento, incluyen ampollas, cartuchos, envases blíster u otros envases de esta clase, apropiados para la administración de GH al paciente a través de una jeringa, bomba (incluidas las osmóticas), catéter, parche transdérmico, nebulizador pulmonar o transmucosal. Los viales apropiados para envasar productos para la administración parenteral, pulmonar, transmucosal o transdérmica son bien conocidos y reconocidos en la técnica.

10 La estabilidad aumentada de las formulaciones de hGH permite la conservación a largo plazo a una temperatura apropiada tal como por debajo del punto de congelación (por ejemplo, a -20°C), o por encima del mismo, preferentemente a 2-8°C y, de forma especialmente preferida, a +5°C, o incluso a temperatura ambiente, por ejemplo, a +25°C.

15 Las formulaciones de hGH que se utilicen para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de filtros de membrana estériles.

Las formulaciones líquidas terapéuticas de hGH se presentan, por lo general, en envases dotados de un punto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa provisto de un tapón que se puede perforar con la aguja de una jeringa hipodérmica.

20 Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención se refiere a una forma de presentación de la formulación líquida según la invención, contenida herméticamente bajo condiciones de esterilidad en un envase apropiado para el almacenamiento antes del uso.

Las formulaciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento del déficit de GH en niños, pérdida de peso y caquexia en pacientes con SIDA, en el síndrome de Turner en niñas, así como en la insuficiencia renal crónica en niños.

25 Una vez descrita la invención, esta se entenderá más fácilmente haciendo referencia al ejemplo siguiente de un proyecto de estudio clínico, que se ofrece a modo de ilustración y que no pretende limitar la presente invención.

EJEMPLO

Se evaluó la estabilidad de las 2 formulaciones siguientes:

Formulación A:

Ingredientes	Formulación A
r-hGH (mg/ml)	8,0
Citrato fosfato sódico, pH 5,8 (mM)	5,0
Sulfato sódico (mM)	100,0
Cloruro de magnesio (mM)	50
Fenol (mg/ml)	3,0
Pluronic F68 (mg/ml)	1,5

30

35

Formulación B:

Ingredientes	Formulación B
r-hGH (mg/ml)	8,0
Citrato fosfato sódico, pH 5,57 (mM)	5,0
Cloruro sódico (mM)	171,0
Cloruro de magnesio (mM)	5
Fenol (mg/ml)	3,0
Pluronic F68 (mg/ml)	0,2

La estabilidad química de las Formulaciones A y B se evaluó tras almacenar las muestras a una temperatura de 40°C durante un periodo de tiempo prolongado, es decir, después de 3 semanas.

- 5 La estabilidad de hGH se determinó por HPLC-RP (HPLC de fase reversa). Por este método, se determinó la cantidad de hormona del crecimiento intacta e inalterada a partir del grado de modificación del pico principal de la hormona del crecimiento humana. Dicho de otra manera, se analizó el grado de variación a partir del cambio del pico principal de la hormona del crecimiento humana y se calculó como porcentaje de r-hGH inalterada frente al pico correspondiente en el tiempo cero.

10 Resultados:

Formulación A:

- Después de conservar la muestra durante 1 mes a 40°C, el pico principal medido para r-hGH representa 62% del pico correspondiente en el tiempo cero (es decir, después de almacenar durante 1 mes a 40°C, se encuentra 62% de r-hGH inalterada).
- 15
- Después de 1 mes de conservación a temperatura ambiente (25°C), el pico principal medido para r-hGH representa 91% del pico correspondiente en el tiempo cero (es decir, después de almacenar durante 1 mes a 25°C, se encuentra 91% de r-hGH inalterada).

Formulación B:

- 20 Después de 3 semanas de almacenamiento a 40°C, el pico principal medido para r-hGH representa 69% del pico correspondiente en el tiempo cero (es decir, después de 3 semanas de almacenamiento a 40°C, se encuentra 69% de r-hGH inalterada).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altschul S.F. et al., *J Mol Biol*, 215, 403-410, 1990
2. Altschul S.F. et al., *Nucleic Acid Res.* 25, 389-3402, 1997
- 5 3. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publications and Wiley Interscience (Nueva York, 1987-1998)
4. Becker et al., *Biotechnol. Appl. Biochem*, 10:326 (1988)
5. Bewly et al., *Int J Peptide and Protein Res.* 4:281-287 (1972)
6. Chen et al., *Genomics* 4:479-497 (1989)
7. Devereux J et al., *Nucleic Acid Res*, 12, 387-395, 1984
- 10 8. Gertler et al., *Endocrinology* 118:720 (1986)
9. Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)
10. Graff et al., *J. Biol. Chem.* 257:2365 (1982)
11. Grantham, *Science*, Vol. 185, págs. 862-864 (1974)
12. Hsiung et al., *Biotechnology* 7:267 (1989)
- 15 13. Lewis et al., *Endocrinology* 101:1587 (1977)
14. Lewis et al., *J. Biol. Chem.* 253:2679 (1978)
15. Lewis et al., *Endocrinology* 104:1256 (1979)
16. Lewis et al., *Biochem.. Biophys. Res. Comm.* 92:511 (1980)
17. Lewis et al., *J. Biol. Chem.* 256:11645 (1981)
- 20 18. Martial et al., *Science* 205:602-607 (1979)
19. Meinkoth J., Wahl G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 1984 1 Mayo; 138(2): 267-84
- 25 20. Pearlman y Nguyen (1989), en D. Marshak y D. Liu (eds), *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulations, Delivery and Targeting*, Current Communications in Molecular Biology, Cold-Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, Nueva York, págs. 23-30
21. Pearson W.R., *Methods in Enzymology*, 183, 63-99, 1990
22. Pearson W.R. y Lipman D.J., *Proc. Nat Acad Sci USA*, 85, 2444-2448, 1988
23. Singh et al., *Endocrinology* 94:883 (1974)
24. Smith et al., *Science* 260:1640-1643 (1998)
- 30 25. Smith and Waterman, *J. Mol. Biol.* 147, 195-197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482-489, 1981
26. Thorlacius-Ussing, *Neuroendocrinology* 43:233 (1987)
27. Documento WO 93/19776
28. Documento WO 94/101398
29. Documento EP-0131864
- 35 30. Documento EP-0211691
31. Documento WO 97/29767
32. Documento US-5.567.677

REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida que comprende:
 - a) una hormona de crecimiento, o una hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), que estimula la liberación o potencia la actividad de la hGH endógena;
 - b) una sal de metal alcalino;
 - c) una sal de metal alcalino-térreo o una sal de metal pseudo-alcalino-térreo; y
 - d) una solución tampón de citrato/fosfato, en donde el pH de la formulación está en el intervalo de 5,5 a 5,8.
2. La formulación según la reivindicación 1, en la que la hormona de crecimiento es hormona del crecimiento humana.
3. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la sal de metal alcalino se selecciona del grupo consistente en NaCl, KCl, Na₂SO₄, Na₂CO₃.
4. La formulación según la reivindicación 3, en la que la sal de metal alcalino es NaCl o Na₂SO₄.
5. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la sal de metal alcalino-térreo se selecciona del grupo consistente en CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, NH₄CO₃.
6. La formulación según la reivindicación 5, en la que la sal alcalino-térrea es MgCl₂.
7. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la solución tampón es una solución tampón de citrato sódico/fosfato sódico.
8. La formulación según la reivindicación 7, en la que la solución tampón está en una concentración en el intervalo de 1 a 100 mM, o de 5 a 50 mM, o de 10 a 20 mM.
9. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente un tensioactivo.
10. La formulación según la reivindicación 9, en la que el tensioactivo es un polietilen-polipropilenglicol.
11. La formulación según la reivindicación 10, en la que el tensioactivo es Pluronic F68.
12. La formulación según las reivindicaciones 10 u 11, que comprende el polietilen-polipropilenglicol en una concentración dentro del intervalo de 0,5 a 5 mg/ml, o 1 a 2 mg/ml, o 1,5 mg/ml.
13. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende adicionalmente un estabilizador.
14. La formulación según la reivindicación 13, en la que el estabilizador es sacarosa.
15. La formulación según la reivindicación 14, que comprende sacarosa en una concentración dentro del intervalo de 10 mg/ml a 100 mg/ml, o 20 mg/ml a 80 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml.
16. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende adicionalmente un conservante.
17. Una formulación según la reivindicación 16, que comprende el conservante en una concentración dentro del intervalo de 1 a 10 mg/ml, o 2 a 5 mg/ml, o 3 mg/ml.
18. La formulación según las reivindicaciones 16 o 17, en la que el conservante es fenol.
19. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde dicha formulación tiene un pH de 5,8 y consiste en r-hGH, citrato sódico/fosfato sódico, Na₂SO₄, MgCl₂, fenol, Pluronic F68 y, opcionalmente, agua para inyección.
20. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde dicha formulación tiene un pH de 5,8 y consiste en r-hGH, citrato sódico/fosfato sódico, NaCl, MgCl₂, fenol, Pluronic F68 y, opcionalmente, agua para inyección.
21. Una composición farmacéutica que comprende la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.
22. Una forma de presentación de la formulación líquida según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, contenida herméticamente bajo condiciones de esterilidad en un envase apropiado para la conservación antes del uso.

23. Uso de una formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para la preparación de un medicamento para tratar el déficit de GH en niños, la pérdida de peso y caquexia en pacientes con SIDA, el síndrome de Turner en niñas, así como en la insuficiencia renal crónica en niños.

5 24. Uso de una formulación según la reivindicación 23, en el que el medicamento es para la administración monodosis.

25. Uso de una formulación según la reivindicación 23, en el que el medicamento es para la administración multidosis.