

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 106**

51 Int. Cl.:

**A61K 33/30** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 38/27** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2002 E 02749622 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 1397155**

54 Título: **Formulación de liberación sostenida**

30 Prioridad:

**21.06.2001 US 300275 P**  
**21.06.2002 US 176961**

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

**16.12.2015**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**  
**1 DNA WAY**  
**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**OKUMU, FRANKLIN y**  
**CLELAND, JEFFREY, L.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 554 106 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 de liberación sostenida

**5 Antecedentes**

Las terapias basadas en proteínas pueden ser más difíciles de administrar a pacientes que otros productos farmacéuticos. Dado que la eficacia de una proteína está relacionada con su conformación, las formulaciones terapéuticas no pueden someterse a condiciones que contribuyan al despliegue, o desnaturalización, de la proteína. Normalmente se usa un cuidado especial en la preparación, almacenamiento y administración de terapias basadas en proteínas. Además de evitar cualquier desnaturalización de la proteína, a menudo es deseable controlar la cantidad de la proteína administrada a un paciente a lo largo del tiempo. Esto ayuda a evitar concentraciones de proteínas en el paciente que son indeseablemente altas o que son demasiado bajas para ser efectivas. Las terapias basadas en proteínas de liberación controlada pueden administrarse mediante varios métodos, que incluyen la administración oral de comprimidos o cápsulas, inhalación de polvos, e implantación de dispositivos a través de los cuales se libera gradualmente la proteína.

La preparación de estas formulaciones normalmente incluye mezclar la proteína con un disolvente orgánico. Por ejemplo, una formulación en polvo puede fabricarse pulverizando una mezcla de la proteína y un disolvente orgánico en nitrógeno líquido. Alternativamente, la proteína puede mezclarse con una solución de un polímero bioerosionable en un disolvente orgánico, con la formación de micropartículas que contienen la proteína y el polímero mediante coagulación de la mezcla. Además, las proteínas, formulaciones en polvo, o micropartículas pueden mezclarse con un disolvente orgánico para producir un líquido o un gel que puede inyectarse en un paciente. Un inconveniente del uso de disolventes orgánicos es su tendencia a provocar la desnaturalización de las proteínas.

Se han usado aditivos para estabilizar proteínas en presencia de un disolvente orgánico desnaturizante. Estos aditivos incluyen tensioactivos (Patente de Estados Unidos n.º 5.096.885), aminoácidos (Patente de Estados Unidos n.º 4.297.344), polioles (Patente de Estados Unidos n.º 5.589.167), polímeros naturales (Documento WO 8903671), polímeros sintéticos (Pharm. Res. 8:285-291, 1991) y metales (Patente de Estados Unidos n.º 6.191.107 B1).

Existe una necesidad para la estabilización mejorada de las proteínas durante la preparación, almacenamiento y administración de las terapias basadas en proteínas. Las formulaciones de proteínas que tienen buena estabilidad en disolventes orgánicos podrían ser útiles en una amplia variedad de aplicaciones de liberación controlada.

**35 Breve resumen**

En un primer aspecto, la presente invención es una composición que comprende una proteína, un poliol y cinc, como se define en las reivindicaciones.

40 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición para la preparación de una formulación, como se define en las reivindicaciones.

En un tercer aspecto, la presente invención es un método de fabricación de una composición de liberación sostenida, que comprende mezclar un compuesto y un vehículo líquido para formar dicha composición de liberación sostenida. El vehículo líquido comprende acetato isobutirato de sacarosa; y el compuesto comprende una proteína, un poliol y cinc, como se define en las reivindicaciones.

50 En un cuarto aspecto, la presente invención es un kit que contiene un recipiente, una proteína, un poliol, cinc, y un vehículo líquido, como se define en las reivindicaciones. El vehículo líquido comprende acetato isobutirato de sacarosa.

La presente invención proporciona una composición, y el uso de la misma, que comprende una proteína, un alcohol, y cinc, como se define en las reivindicaciones. El alcohol se selecciona del grupo que consiste en un monosacárido, un polisacárido, glicerol, manitol, sorbitol, inositol y polietilenglicol.

55 La presente invención proporciona un método de fabricación de una composición de liberación sostenida, que comprende mezclar un compuesto y un vehículo líquido para formar dicha composición de liberación sostenida. El vehículo líquido comprende acetato isobutirato de sacarosa; y el compuesto comprende una proteína, un alcohol, y cinc, como se define en las reivindicaciones. El alcohol se selecciona del grupo que consiste en un monosacárido, un polisacárido, glicerol, manitol, sorbitol, inositol y polietilenglicol.

60 La presente invención proporciona un kit que contiene un recipiente, una proteína, un alcohol, cinc, y un vehículo líquido como se define en las reivindicaciones. El vehículo líquido comprende acetato isobutirato de sacarosa. El alcohol se selecciona del grupo que consiste en un monosacárido, un polisacárido, glicerol, manitol, sorbitol, inositol y polietilenglicol.

65

### Breve descripción de los dibujos

Otros diversos objetos, características y ventajas relacionadas de la presente invención se apreciarán más completamente cuando las mismas lleguen a entenderse mejor a partir de la descripción detallada a continuación cuando se considera en conexión con los dibujos adjuntos en los que caracteres de referencia iguales designan partes iguales o correspondientes a todo lo largo de las diversas vistas y en los que:

La Figura 1 es una vista de un vial que contiene una composición inyectable.

### 10 Descripción detallada

La presente invención se refiere a la estabilización de una proteína con un poliol y un metal, que protege la proteína de la desnaturalización cuando entra en contacto con un disolvente orgánico. El grado de retención de la conformación nativa de la proteína es un efecto inesperado y sorprendente de la combinación de una proteína con ambos un poliol y un metal. El poliol y el metal juntos proporcionan una protección sinérgica de la conformación y actividad de la proteína que es mayor que la que podría esperarse del efecto que o bien el poliol o el metal tienen por separado.

El poliol es un alcohol, y puede ser cualquier hidrocarburo que contenga dos o más grupos hidroxilo (-OH) unidos al carbono, donde el hidrocarburo se refiere a un compuesto que contiene carbono e hidrógeno, que también puede contener heteroátomos tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo y halógeno. El término poliol excluye aquellos compuestos que no proporcionan una recuperación de monómero de al menos el 40 %, de acuerdo con el siguiente ensayo:

Una mezcla de hormonas del crecimiento humano recombinantes (rhGH, GENENTECH, S. San Francisco, CA) en bicarbonato de sodio 25 mM (25 mg de rhGH/ml) se combina con acetato de cinc para proporcionar una relación molar 10:1 de cinc a hormona del crecimiento. A esta mezcla se añade un 1 por ciento en peso (% en peso) del poliol que se ensaya. Después se añade 1,0 mg de muestra de esta mezcla a N-metil pirrolidona (NMP), proporcionando una relación de masa de proteína (mg) a volumen de disolvente (ml) de 5 mg/ml. La mezcla resultante se homogeniza durante 2 min a 8.000 rpm con una punta del homogeneizador de cizalladura y después se incuba a 37 °C durante 24 horas. La rhGH se recupera mediante dilución en 10 veces más de un tampón estabilizante (EDTA 5 mM, HEPES 50 mM, 0,01 % de NaN<sub>3</sub>, pH 8,0). Después se determina la cantidad y calidad de la proteína recuperada en esta etapa mediante cromatografía de exclusión molecular - cromatografía líquida de alta resolución (SEC-HPLC), usando una columna TSK 2000-SWXL de 7,8 X 300 mm a temperatura ambiente, con una fase móvil de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2, una velocidad de flujo de 1,0 ml/min y un tiempo de operación de 20 min. La proteína (10 µg) se inyecta y el eluyente se monitoriza por la absorbancia a 214 nm.

Los ejemplos de polioles incluyen monosacáridos, tales como glucosa, fructosa, y ribosa, incluyendo isómeros cíclicos; glicerol; manitol; sorbitol; inositol; polisacáridos, incluyendo disacáridos tales como sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa, y celobiosa, y trisacáridos tales como 3-fucosil lactosa y trisacárido del grupo B sanguíneo; y poliéteres tales como polietilenglicoles (PEG). El término "poliéter" significa un hidrocarburo que contiene tres o más enlaces éter (C-O-C). El poliol puede estar sustituido. "Sustituido" significa que el resto contiene al menos uno, preferentemente 1-3 sustituyente(s). Los sustituyentes adecuados incluyen éter (-O-C), amino (-NH<sub>2</sub>), oxo (-O-), carbonilo (>C=O), tiol y similares. Preferentemente, el poliol es manitol, trehalosa, o un polietilenglicol. Los polietilenglicoles preferidos tienen un peso molecular, medido mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) de 400 kDa a 8.000 kDa. Más preferentemente, el polietilenglicol tiene un peso molecular de 400 kDa a 3.500 kDa. Se prefiere que el poliol tenga un peso molecular de menos de aproximadamente 70.000 kDa.

Las cantidades relativas de proteína y poliol en una formulación pueden elegirse para minimizar la desnaturalización de las proteínas. Para una proteína dada, la relación ideal puede variar dependiendo del poliol usado. Preferentemente, la relación en masa de trehalosa a proteína es de 100:1 a 1:100. Más preferentemente, la relación en masa de trehalosa a proteína es de 1:1 a 1:10. Incluso más preferentemente, la relación en masa de trehalosa a proteína es de 1:3 a 1:4. Preferentemente, la relación en masa de manitol a proteína es de 100:1 a 1:100. Más preferentemente, la relación en masa de manitol a proteína es de 1:1 a 1:10. Incluso más preferentemente, la relación en masa de manitol a proteína es de 1:1 a 1:2. Preferentemente, la relación en masa de PEG a proteína será de 100:1 a 1:100. Más preferentemente, la relación en masa de PEG a proteína es de 1:1 a 1:10.

El metal es preferentemente divalente, más preferentemente, el metal es cinc. El metal puede añadirse a la proteína mediante el mezclado de una solución acuosa de la proteína con un compuesto de metal. Por ejemplo, puede añadirse un compuesto de cinc tal como acetato de cinc, óxido de cinc, o carbonato de cinc a una solución o suspensión de la proteína en un tampón. Preferentemente, la relación molar de metal a proteína es de 1:1 a 100:1. Más preferentemente, la relación molar de metal a proteína es de 1:1 a 20:1. Incluso más preferentemente, la relación molar de metal a proteína es de 1:1 a 10:1.

65

Las proteínas útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas tales como citoquinas y sus receptores, así como proteínas quiméricas que comprenden citoquinas o sus receptores, incluyendo, por ejemplo el factor de necrosis tumoral alfa y beta, sus receptores (TNFR-1; Gray et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7380-7384; and TNFR-2; Kohno et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8331-8335) y sus derivados; renina; 5 hormonas del crecimiento, que incluyen hormona del crecimiento humano, hormona de crecimiento bovino, hormona del crecimiento humano metionina, hormona del crecimiento humano des-fenilalanina, y hormona de crecimiento porcino; factor liberador de hormona de crecimiento (GRF); hormonas paratiroides y pituitarias; hormona estimulante del tiroides; factor liberador de hormona del páncreas humano; lipoproteínas; colchicina; prolactina; corticotropina; hormona tirotrópica; oxitocina; vasopresina; somatostatina; lipresina; pancreocimina; leuprolide; alfa-10 1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH); agonistas y antagonistas de LHRH; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular y el factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno aparte de un activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA), por ejemplo una uroquinasa; 15 bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; encefalinas; RANTES (regulado sobre la activación de células T normales expresado y secretado); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina de suero tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora mülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; gonadotropina coriónica; hormona liberadora de gonadotropina; somatotropina bovina; somatotropina porcina; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o 20 factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, -6 o (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento fibroblástico, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, o TGF-β5; factor de crecimiento tipo insulina-I y -II (IGF-I e IGF-II); des (1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas unidas al factor de crecimiento tipo insulina; proteínas CD, tales como CD-3, CD-4, CD-8, y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como el interferón-alfa, -beta, -gamma, y el interferón de consenso; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, 30 y G-CSF; interleucinas (ILS), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de la membrana de superficie; factor acelerador de la degradación; antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la glicoproteína de la envoltura del VIH-1, gp120, gp160 o fragmentos de los mismos; proteínas de transporte; receptores de homing; adresinas; inhibidores de la fertilidad tales como las prostaglandinas; promotores de la fertilidad; proteínas reguladoras; anticuerpos y proteínas quiméricas, tales como inmunoadhesinas; análogos y 35 derivados de estos compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos, o sus análogos o derivados.

Preferentemente, la proteína contiene hasta 120 aminoácidos por una única cadena. Preferentemente, la proteína es capaz de complejarse con un metal. La complejación de proteína-metal tienen una constante de disociación ( $K_D$ ) del orden de micromolar ( $\mu\text{M}$ ) o más pequeña, tal y como se mide en el agua a temperaturas y pH fisiológicos. El valor  $K_D$  se define como el producto de la concentración del metal no complejado y la proteína no complejada, dividido entre la concentración del complejo proteína-metal. Una interacción no específica entre una proteína y un metal a las mismas condiciones tiene un  $K_D$  del orden de milimolar (mM). Preferentemente, el complejo proteína-metal tiene un  $K_D$  de 0,1  $\mu\text{M}$  o más pequeño. Más preferentemente, el complejo proteína-metal tiene un  $K_D$  de 0,01  $\mu\text{M}$  o más pequeño. 45

Más preferentemente, la proteína es una hormona del crecimiento, tal como una hormona del crecimiento humano (hGH), hormona del crecimiento humano recombinante (rhGH), hormona de crecimiento bovino, hormona del crecimiento humano metionina, hormona de crecimiento humano des-fenilalanina, y hormona de crecimiento porcino; insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, y proinsulina; o un factor de crecimiento, tal como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF), y factor de crecimiento tipo insulina-I y -II (IGF-I e IGF-II). 50

Las formulaciones de proteínas que se estabilizan con un poliol y un metal también pueden contener otros ingredientes. Estos ingredientes incluyen, por ejemplo, conservantes, antioxidantes, agentes de carga, agentes tensioactivos, agentes quelantes, agentes emulsionantes y otros excipientes. El término "excipiente" se refiere a un agente no terapéutico añadido a una composición farmacéutica para proporcionar una consistencia o efecto estabilizante deseados. Los conservantes incluyen, por ejemplo, fenol, alcohol bencílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio, y cloruro de bencetonio. Los tensioactivos incluyen, por ejemplo, POLISORBATO 20 y 80. 60

La proteína, poliol, y metal, junto con cualesquiera otros ingredientes, pueden combinarse en una etapa única o en dos o más etapas. Preferentemente, la proteína se compleja con el metal antes de la adición del poliol. Por ejemplo, la proteína, poliol, metal, e ingredientes opcionales pueden mezclarse en un tampón acuoso para formar una solución, emulsión, o suspensión. Los tampones útiles incluyen, por ejemplo, tampones fosfato, Tris, citrato, 65

succinato, acetato, e histidina. Normalmente, el tampón está en el intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 100 mM. Los tampones preferidos incluyen tampones de succinato de sodio y de fosfato de potasio.

5 La formulación acuosa de proteína, poliol, y metal puede usarse para administrar la terapia basada en proteína, o la formulación puede procesarse adicionalmente. Por ejemplo, la formulación puede convertirse en un sólido mediante liofilización o deshidrocongelación, o puede incorporarse en un polímero bioerosionable. Un polímero bioerosionable se descompone cuando se coloca en el interior de un organismo, medido por una disminución en el peso molecular del polímero a lo largo del tiempo. Los pesos moleculares del polímero pueden determinarse mediante varios  
10 métodos incluyendo la cromatografía de exclusión molecular (SEC), y generalmente se expresan como promedios en peso o promedios en número. Un polímero es bioerosionable si, cuando en un tampón fosfato salino (PBS) de pH 7,4 y una temperatura de 37 °C, su peso molecular promedio en peso se reduce en al menos un 25 % en un periodo de 6 meses medido mediante SEC. Los polímeros bioerosionables útiles incluyen poliésteres, tales como poli(caprolactona), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), y poli(hidroxibutirato); polianhídridos, tales como poli(anhídrido adípico) y poli(anhídrido maleico); polidioxanona; poliaminas; poliamidas; poliuretanos; poliésteramidas; polioortoésteres; poliacetales; policetales; policarbonatos; poliortocarbonatos; polifosfacenos; poli(ácido málico); poli(aminoácidos); polivinilpirrolidona; poli(metil vinil éter); poli(oxalato de alquileo); poli(succinato de alquileo); polihidroxicelulosa; quitina; quitosano; y copolímeros y mezclas de los mismos. Las proteínas pueden incorporarse en polímeros bioerosionables mediante la formación de implantes monolíticos, que se implantan  
20 quirúrgicamente, o mediante la formación de micropartículas del polímero bioerosionable que contiene la proteína.

La composición también puede incluir un líquido vehículo. Preferentemente, la formulación de proteína, poliol, y metal puede mezclarse con un líquido vehículo para inyectarse en un paciente; sin embargo, es posible cualquier orden de mezclado de estos ingredientes. Las formulaciones sólidas y las micropartículas también pueden  
25 inyectarse cuando se mezclan con un vehículo líquido. Se prefiere que la relación del volumen del vehículo líquido a la masa combinada de la proteína y el metal sea de 99:1 a 70:30 p/v. Más preferentemente, la relación del vehículo líquido a la proteína y el metal es de 95:5 a 85:15 p/v. Para un implante administrado mediante inyección, la mezcla líquida preferentemente se transforma en un depósito tras entrar en contacto con el fluido en el cuerpo. Este depósito se caracteriza por su separación de fase del fluido fisiológico y su viscosidad aumentada en comparación con la composición del líquido original. Es este depósito el que sirve para liberar de manera controlada la proteína.

El vehículo líquido puede ser un polímero bioerosionable que solidifica tras la administración. Alternativamente, el vehículo líquido puede ser un agente que proporciona un aumento de la viscosidad tras la administración. Los ejemplos de estos agentes incluyen ácido hialurónico, así como acetato isobutirato de sacarosa (SAIB) como se usa  
35 en el sistema SABER (SOUTHERN BIOSYSTEMS, Birmingham, AL). El sistema SABER es un sistema de administración de un fármaco inyectable que se compone de un material líquido no polimérico y un disolvente orgánico (Patente de Estados Unidos n.º 5.747.058; Smith y Tipton (1996) Pharmaceutical Research 13(3):300). El SABER se inyecta como un líquido de baja viscosidad que aumenta rápidamente en viscosidad tras la inyección. La matriz de alta viscosidad resultante es adhesiva, biodegradable y biocompatible.

40 El material líquido no polimérico en el sistema SABER es un líquido no soluble en agua que tiene una viscosidad de al menos 5.000 centipoises (cP) a 37 °C que no cristaliza en estado puro en condiciones fisiológicas ambientales. La viscosidad del líquido puede medirse usando un viscosímetro CANON-FENSKE a una temperatura de 25 °C. La viscosidad cinemática de la composición SABER, que incluye el material líquido y el disolvente, es preferentemente de menos de 1.000 cP a temperatura ambiente. Más preferentemente, la viscosidad cinemática de la composición SABER es de menos de 200 cP a temperatura ambiente. Los materiales líquidos adecuados incluyen ésteres de estearato, amidas de estearato, amidas de ácidos grasos de cadena larga, alcoholes grasos de cadena larga, ésteres de cadena larga, y ésteres de disacáridos. Preferentemente, el material líquido es diestearato de sacarosa acetilado, acetato butirato de disacárido, o SAIB. La relación en peso de material líquido a disolvente es preferentemente de 50:50 a 85:15 p/p. Más preferentemente, la relación en peso de material líquido a disolvente es de 50:50 a 70:30 p/p.

Normalmente estas formulaciones también incluyen uno o más disolventes orgánicos, tales como cloruro de metileno, acetato de etilo, sulfóxido de dimetilo (DMSO), tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), etanol (EtOH), N-metil pirrolidona (NMP), benzoato de bencilo, alcohol bencílico, Migliol, y carbonato de propileno. La estabilidad de una proteína en presencia de un disolvente orgánico se mide al recuperar la proteína del disolvente y medir el porcentaje de la proteína que está intacto (es decir, no desnaturizado). La proteína que no está  
55 desnaturizada se refiere como monómero, dado que las proteínas desnaturizadas tienden a agregarse juntas. El porcentaje de monómero puede medirse mediante HPLC-SEC. Preferentemente, el porcentaje de monómero recuperado es del 35 % al 100 %. Más preferentemente, el porcentaje de monómero recuperado es del 70 % al 100 %. Incluso más preferentemente, el porcentaje de monómero recuperado es del 90 % al 100 %. Incluso más preferentemente, el porcentaje de monómero recuperado es del 95 % al 100 %. Incluso más preferentemente, el porcentaje de monómero recuperado es del 99 % al 100 %.

65 Cuando la composición se administra *in vivo*, preferentemente menos del 10 % de la proteína se libera del depósito a las 24 horas de la administración, más preferentemente menos del 5 % de la proteína se libera del depósito a las

24 horas de la administración, incluso más preferentemente menos del 1 % de la proteína se libera del depósito a las 24 horas de la administración, incluso más preferentemente menos del 0,2 % de la proteína se libera del depósito a las 24 horas de la administración, incluso más preferentemente menos del 0,01 % de la proteína se libera del depósito a las 24 horas de la administración. El organismo al que se le administra la composición puede ser, por ejemplo, una rata o un ser humano.

Preferentemente la liberación de la proteína ocurre en un periodo de días, semanas, o meses. Se prefiere que al menos el 25 % del total de la cantidad de proteína se libere en un año desde la administración, más preferentemente al menos el 25 % de la cantidad total de la proteína se libere en un mes desde la administración, más preferentemente al menos el 25 % de la cantidad total de la proteína se libere en una semana desde la administración. Alternativamente, se prefiere que al menos el 20 % de la cantidad total de proteína se libere en un año desde la administración, más preferentemente al menos el 20 % de la cantidad total de la proteína se libere en un mes desde la administración, más preferentemente al menos el 20 % de la cantidad total de la proteína se libere en una semana desde la administración. La duración deseada del periodo de liberación variará de acuerdo con el tratamiento fisiológico deseado. Se prefiere que la cantidad de proteína liberada en un periodo de 24 horas sea del 0,01 % al 5 %. Más preferentemente, la cantidad de proteína liberada en un periodo de 24 horas sea del 0,05 % al 3 %. Incluso más preferentemente, la cantidad de proteína liberada en un periodo de 24 horas sea del 1 % al 3 %.

La composición puede envasarse convenientemente en un recipiente estéril, tal como el vial 10 ilustrado en la Figura 1. Este recipiente puede ser parte de un kit que opcionalmente puede contener una jeringa y una aguja estériles. El vial 10 puede sellarse con una membrana 12. Esta membrana sella el líquido 14 y puede perforarse por una jeringa y aguja para permitir la retirada de la mezcla. El vial puede contener todos los ingredientes necesarios para la liberación controlada de la proteína. La composición líquida en el vial preferentemente contiene una dosificación unitaria de la proteína. Se prefiere que el usuario final de la mezcla no necesite agregar ingredientes adicionales o medir la dosis antes de la administración. La composición líquida puede estar contenida en una jeringa de tal manera que pueda administrarse directamente mediante inyección.

Alternativamente, la composición puede envasarse en más de un recipiente. Por ejemplo, un vehículo líquido puede estar en un vial y una mezcla de la proteína en un disolvente o mezcla de disolventes puede estar en otro vial. Los disolventes y/o las mezclas de disolventes pueden ser los mismos que o diferentes del vehículo líquido. Los contenidos de los viales pueden combinarse y mezclarse y la composición final administrarse mediante inyección. En otro ejemplo, la formulación de proteína, poliol, y metal puede estar en un recipiente y el vehículo líquido puede estar en otro recipiente. La proteína, el poliol y el metal pueden proporcionarse juntos como un polvo, o la proteína, el poliol y el metal pueden proporcionarse juntos como un comprimido o cápsula. La proteína, el poliol y el metal pueden combinarse con el vehículo líquido y la composición final administrarse mediante inyección. En otro ejemplo, el poliol y el metal pueden proporcionarse como una mezcla en el vehículo líquido en un vial y la proteína puede proporcionarse en un recipiente separado. Alternativamente, la proteína puede proporcionarse como una mezcla en el vehículo líquido en un vial y el poliol y el metal pueden proporcionarse en un recipiente separado. Los contenidos de los recipientes pueden combinarse de tal manera que se forme una formulación líquida y la composición final se administre mediante inyección.

Preferentemente, el envase de la composición o sus componentes son desechables, más preferentemente reciclables. Se prefiere que la composición y su envase sean estériles.

## 45 Ejemplos

### Ejemplo 1 - Formulaciones de proteína estabilizadas

Se produjo una formulación sólida de la hormona del crecimiento al combinar rhGH (GENENTECH, S. San Francisco, CA) en bicarbonato de sodio 25 mM (25 mg de rhGH/ml) con acetato de cinc para proporcionar una relación molar 10:1 de cinc a hormona del crecimiento. En las formulaciones 2 y 5, el poliol se añadió a esta mezcla a la concentración indicada. En las formulaciones 3 y 4, no se añadió cinc ni antes ni después de la adición del poliol. En la formulación 1, no se añadió poliol a la mezcla de rhGH y cinc.

El efecto de los disolventes orgánicos en la estabilidad de la proteína se determinó al añadir la formulación sólida de rhGH (1,0 mg) a o bien etanol absoluto (EtOH) o N-metil pirrolidona (NMP). La relación de masa de proteína (mg) a volumen de disolvente (ml) fue 5 mg/ml. Tras la adición de la proteína, las muestras se homogeneizaron durante 2 min a 8.000 rpm con una punta del homogeneizador de cizalladura. Las suspensiones resultantes se dejaron en incubación a 37 °C durante 24 horas. La rhGH se recuperó mediante dilución en 10 veces más de un tampón estabilizante (EDTA 5 mM, HEPES 50 mM, 0,01 % de NaN<sub>3</sub>, pH 8,0). La cantidad y calidad de la proteína recuperada en esta etapa se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular - cromatografía líquida de alta resolución (SEC-HPLC) y los resultados se muestran en la Tabla 1. La SEC-HPLC se operó usando una columna TSK 2000-SWXL de 7,8 X 300 mm a temperatura ambiente, con una fase móvil de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2. La velocidad del flujo era 1,0 ml/min y el tiempo de operación era 20 min. La proteína (10 µg) se inyectó y el eluyente se monitorizó por la absorbancia a 214 nm.

Los criterios para una formulación estable eran la recuperación máxima de la rhGH monomérica sin la formación de agregados. Las muestras control de cada formulación se analizaron mediante incubación en el tampón sin la exposición a un disolvente orgánico y los resultados indican que el material de inicio para cada formulación no contenía cantidades significativas de agregados.

5 La presencia de un poliol y cinc proporcionan una protección superior frente a la desnaturalización de las proteínas tras la exposición a etanol y NMP. Las formulaciones que contenían ambos un poliol y cinc produjeron una recuperación más alta del monómero que las formulaciones estabilizadas con solo poliol o solo cinc.

10 Tabla 1. Efecto de los disolventes orgánicos en la estabilidad de la rhGH

Formulación	Concentración de poliol (% en peso)		Cinc:rhGH (relación molar)	% de monómero recuperado (Media±DE)		% de monómero recuperado (Control)
	Manitol	Trehalosa		EtOH	NMP	
1	0	0	10:1	31±8	37±3	98
2	1	0	10:1	36±1	44±1	98
3	1	0	0	22±1	19±1	98
4	0	5	0	65±1	88±1	99
5	0	5	10:1	72±1	89±0	99

Ejemplo 2 - Formulación de liberación controlada

15 Las formulaciones sólidas de hormona del crecimiento se produjeron al combinar rhGH con cinc y/o un poliol. En las formulaciones 12-20, la rhGH en bicarbonato de sodio 25 mM (20 mg de rhGH/ml) se combinó con acetato de cinc para proporcionar una relación molar 10:1 de cinc a hormona del crecimiento. En las formulaciones 12-19, el poliol después se añadió a la mezcla a la concentración indicada. Las formulaciones 13 y 17 adicionalmente incluyeron un 0,02 % de POLISORBATO 20, que se añadió con el poliol. En las formulaciones 6-11, el poliol se añadió a la mezcla de rhGH sin la adición de cinc.

20 El efecto del poliol y cinc en la estabilidad de la proteína en un sistema de liberación controlada se determinó al añadir la formulación de rhGH en SABER (100 µl) en 2 ml del tampón de liberación. La formulación contenía una carga del 5 % de rhGH en una mezcla 80:20 de SAIB y alcohol bencílico. El tampón era HEPES de 50 mM, KCl 95 mM, pH 7,2. Las suspensiones resultantes se almacenaron a 37 °C durante 24 horas. La cantidad y calidad de la proteína recuperada en esta etapa se determinó mediante SEC-HPLC y los resultados se proporcionan en la Tabla 2. El medio de liberación completo se analizó mediante SEC-HPLC para determinar el contenido de proteínas total y el porcentaje de proteína no agregada presente, usando un método similar al descrito en Maa et. al., J. Pharm Sci. 2(87) 152-159, 1998.

30 Las formulaciones que contienen solo un poliol o solo cinc permitieron la desnaturalización significativa de la proteína, con un máximo de recuperación de monómero del 91,5 %. La presencia de ambos un poliol y cinc protegió de manera efectiva la proteína de la desnaturalización. Estas formulaciones proporcionaron aproximadamente una recuperación de monómero del 99 %. La combinación de poliol y cinc también permite velocidades de liberación aceptables de la proteína del depósito, en 24 horas libera entre un 10 y un 15 %.

35 Tabla 2

Formulación	Concentración de poliol		Relación molar cinc:rhGH	% liberado		% de monómero recuperado
	Manitol	Trehalosa		1 día	DE	
6	1	0	0	17	5,9	85,4
7	5	0	0	8	0,1	89,7
8	10	0	0	36	0,04	74,7
9	0	1	0	15	0,2	83,4
10	0	5	0	6	0,7	90,5
11	0	10	0	6	0,2	91,5
12	1	0	10:1	12	0,6	98,8
13	1*	0	10:1	10	3,2	99,1
14	5	0	10:1	12	1,0	99,2
15	10	0	10:1	10	0,3	99,2

## ES 2 554 106 T3

16	0	1	10:1	10	0,01	98,9
17	0	1*	10:1	10	0,9	98,9
18	0	5	10:1	15	2,2	99,2
19	0	10	10:1	14	1,4	99,2
20	0	0	10:1	12	1,2	83,9
21	0	0	0	10	5,3	91,1
* Formulado adicionalmente con un 0,02 % del tensioactivo POLISORBATO 20						

Obviamente, son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las anteriores enseñanzas. Por lo tanto se ha de entender que la invención puede ponerse en práctica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, de forma distinta a como se describe específicamente en los Ejemplos en el presente documento.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición, que comprende:

5 una proteína, en donde la proteína es una hormona del crecimiento humano recombinante;  
un poliol; y  
un catión metálico, en donde el catión metálico es cinc divalente;  
en la que la relación en masa de poliol a proteína es de 1:1 a 1:100 y la relación molar de cinc a proteína es de  
1:1 a 100:1 y en la que el poliol y cinc juntos proporcionan una protección sinérgica de la actividad y  
10 conformación de la proteína, y adicionalmente comprende un disolvente orgánico.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que:

15 (a) dicho poliol se selecciona del grupo que consiste en un monosacárido, un polisacárido, glicerol, manitol,  
sorbitol, inositol y polietilenglicol; o  
(b) dicho poliol se selecciona del grupo que consiste en manitol, trehalosa y polietilenglicol.

3. La composición de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en la que la relación en masa de poliol a proteína es  
de 1:1 a 1:10.

20 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que:

(a) la relación molar de cinc a proteína es de 1:1 a 20:1; o  
(b) la relación molar de cinc a proteína es de 1:1 a 10:1.

25 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que adicionalmente comprende un material  
transportador;  
en la que el material transportador comprende un material líquido no polimérico, no soluble en agua, que tiene una  
viscosidad de al menos 5.000 cP a 37 °C que no cristaliza en estado puro en condiciones fisiológicas ambientales.

30 6. La composición de la reivindicación 5, en la que el material líquido es un éster de estearato, una amida de  
estearato, una amida de ácidos grasos de cadena larga, un alcohol graso de cadena larga, un éster de cadena larga  
o un éster de disacárido.

35 7. La composición de la reivindicación 5, en la que el material líquido es diestearato de sacarosa acetilado o el  
material líquido es acetato butirato de disacárido o el material líquido es acetato isobutirato de sacarosa.

8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que:

40 (a) la composición tiene una viscosidad de menos de 1000 cP a temperatura ambiente; o  
(b) la composición tiene una viscosidad de menos de 200 cP a temperatura ambiente.

9. Uso de una composición para la preparación de una formulación que adicionalmente comprende un disolvente  
orgánico, en donde la composición comprende:

45 una proteína, en donde la proteína es una hormona del crecimiento humano recombinante;  
un poliol; y  
un catión metálico, en donde el catión metálico es cinc divalente;  
50 en donde la relación en masa de poliol a proteína es de 1:1 a 1:100 y la relación molar de cinc a proteína es de 1:1 a  
100:1 y en donde el poliol y el cinc juntos proporcionan una protección sinérgica de la conformación y actividad de la  
proteína.

10. El uso de la reivindicación 9, en donde:

55 (a) dicho poliol se selecciona del grupo que consiste en un monosacárido, un polisacárido, glicerol, manitol,  
sorbitol, inositol y polietilenglicol; o  
(b) dicho poliol se selecciona del grupo que consiste en manitol, trehalosa y polietilenglicol.

60 11. El uso de la reivindicación 9 o de la reivindicación 10, en donde la relación en masa de poliol a proteína es de 1:1  
a 1:10.

12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde:

65 (a) la relación molar de cinc a proteína es de 1:1 a 20:1; o  
(b) la relación molar de cinc a proteína es de 1:1 a 10:1.

13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que adicionalmente comprende un material transportador;  
5 en donde el material transportador comprende un material líquido no polimérico, no soluble en agua, que tiene una viscosidad de al menos 5.000 cP a 37 °C que no cristaliza en estado puro en condiciones fisiológicas ambientales.
14. El uso de la reivindicación 13, en donde el que el material líquido es un éster de estearato, una amida de estearato, una amida de ácidos grasos de cadena larga, un alcohol graso de cadena larga, un éster de cadena larga o un éster de disacárido.  
10
15. El uso de la reivindicación 13, en donde el material líquido es diestearato de sacarosa acetilado o el material líquido es acetato butirato de disacárido o el material líquido es acetato isobutirato de sacarosa.
16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en donde:  
15 (a) la composición tiene una viscosidad de menos de 1.000 cP a temperatura ambiente; o  
(b) la composición tiene una viscosidad de menos de 200 cP a temperatura ambiente.
17. Uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para la preparación de una formulación de liberación sostenida inyectable, en donde el poliol y el cinc juntos proporcionan una protección sinérgica de la conformación y actividad de la proteína.  
20
18. Uso de una composición de la reivindicación 17, en donde entre un 10 y un 15 % de la proteína se libera a las 24 horas de la administración.  
25
19. Un método de fabricación de una composición de liberación sostenida, que comprende:  
mezclar una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo líquido para formar dicha composición de liberación sostenida; en la que dicho vehículo líquido comprende acetato isobutirato de sacarosa.  
30
20. El método de la reivindicación 19, en el que:  
(a) dicha composición de liberación sostenida tiene una viscosidad de menos de 1.000 cP a temperatura ambiente; o  
35 (b) dicha composición de liberación sostenida tiene una viscosidad de menos de 200 cP a temperatura ambiente.
21. El método de las reivindicaciones 19 o 20, en el que dicho disolvente es etanol, benzoato de bencilo, migliol, carbonato de propileno o alcohol bencilico.
- 40 22. El método de la reivindicación 21, en el que:  
(a) la relación de acetato isobutirato de sacarosa a disolvente es de 50:50 p/p a 85:15 p/p; o  
(b) la relación de acetato isobutirato de sacarosa a disolvente es de 50:50 p/p a 70:30 p/p.
- 45 23. Un kit, que comprende:  
un recipiente;  
una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y  
un vehículo líquido;  
50 en el que el vehículo líquido comprende acetato isobutirato de sacarosa.
24. El kit de la reivindicación 23, que comprende una dosificación unitaria de la proteína.
- 55 25. El kit de la reivindicación 23 o de la reivindicación 24, en el que el poliol, el catión metálico y el vehículo líquido son estériles.
26. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, que adicionalmente comprende una jeringa.
- 60 27. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en el que el recipiente comprende una membrana.

**FIG. 1**

