

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 022**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61K 38/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2011** **PCT/KR2011/005194**
87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012** **WO12008779**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2011** **E 11807064 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 2593084**

54 Título: **Una formulación líquida de conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada**

30 Prioridad:

14.07.2010 KR 20100067796

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2018

73 Titular/es:

HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, KR

72 Inventor/es:

HONG, SUNG HEE;
LEE, BYUNG SUN;
IM, DAE SEONG;
LEE, JAE MIN;
BAE, SUNG MIN y
KWON, SE CHANG

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 673 022 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

Una formulación líquida de conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una formulación líquida de conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada, libre de albúmina, la cual puede garantizar la estabilidad del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada cuando se almacena durante un largo periodo de tiempo, en la que el conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada comprende una hormona de crecimiento humano unida a una región Fc de inmunoglobulina, y tiene una estabilidad *in vivo* prolongada en comparación con la forma nativa.

15 **Antecedentes de la técnica**

La hormona de crecimiento humano (más adelante referida como "hGH") es una hormona peptídica aglicosilada que se secreta a partir de la glándula pituitaria anterior e interactúa con un receptor específico sobre la superficie celular en diversos tejidos para imitar la secreción de otros factores de crecimiento, para explicar el incremento del tamaño de diversas partes del cuerpo. Desde entonces el descubrimiento de que la hormona de crecimiento de la glándula pituitaria humana es una terapia eficaz para enanismo de la pituitaria, se ha incrementado vertiginosamente la demanda de hGH. Sin embargo, el suministro de hGH que se puede extraer de la glándula pituitaria humana es muy limitado. Además, después de la incidencia del trastorno neurológico degenerativo enfermedad de Creutzfeldt-Jacob en niños que recibieron hGH derivada de cadáver, la FDA en los Estados Unidos de América ha prohibido el uso de la hGH extraída de las glándulas pituitarias de un cadáver, basándose en el supuesto de que los priones infecciosos que causaban la enfermedad se transferían junto con la hGH derivada de cadáver (Roger, L., *Science* 234:22, 1986). Actualmente, la hormona de crecimiento humano biosintética producida por *E. coli* usando la tecnología de recombinación génica está comercialmente disponible con la aprobación de la FDA.

Los polipéptidos, tales como la hGH, tienen tendencia a degenerarse debido a su baja estabilidad, y son degradados fácilmente por proteasas de suero y se eliminan por el riñón o el hígado. Por lo tanto, los fármacos que contienen polipéptidos como principios farmacéuticamente activos se tienen que administrar con frecuencia a los pacientes para mantener los niveles en suero y los títulos de los mismos. Sin embargo, el mantenimiento de los altos niveles en suero de los polipéptidos activos mediante la administración frecuente de fármacos proteicos, los cuales están en forma de inyecciones en la mayoría de los casos, es doloroso para los pacientes.

Para resolver estos problemas, los intentos se han realizado hacia maximizar los efectos medicinales mejorando la estabilidad en suero de los fármacos proteicos y manteniendo un alto nivel en suero de los fármacos proteicos durante un largo periodo. Por lo tanto, es necesario formulaciones de los fármacos proteicos que han incrementado la estabilidad y mantenido la actividad a niveles suficientemente altos sin inducir respuestas inmunes en pacientes.

Para estabilizar las proteínas y prevenir el contacto con proteasa y la pérdida renal, convencionalmente, polímeros altamente solubles, tales como polietilenglicol (PEG), se añaden químicamente a la superficie de los fármacos proteicos. Al estar no específicamente conjugado a ciertos o diversos sitios de las proteínas diana, PEG puede incrementar la solubilidad de las proteínas diana, estabilizar las proteínas e impedir que se degraden, sin causar efectos secundarios significativos (Sada y col., *J. Fermentation Bioengineering*, 1991, 71:137-139). La conjugación de PEG puede contribuir a la estabilidad de las proteínas, pero disminuye significativamente su actividad. PEG de mayor peso molecular tiene una reactividad reducida con las proteínas, reduciendo así el rendimiento.

Una estrategia alternativa para incrementar la estabilidad *in vivo* de las proteínas físicamente activas es usando recombinación genética para fusionar las proteínas diana y las proteínas que tienen alta estabilidad en suero, lo cual es un proceso de unión de los genes respectivos que codifican las proteínas unos a otros y cultivo de las células animales transformadas con los genes fusionados. Se ha publicado, por ejemplo, proteínas de fusión en las que la albúmina o sus fragmentos, conocidos por incrementar la estabilidad de las proteínas, se fusionaban a proteínas diana mediante la recombinación genética (Publicación de Patente Internacional N° WO 93/15199 y WO 93/15200, Publicación de Patente Europea N° EP 413.622).

El documento de Patente americana N° 5.045.312 describe que hGH conjugada con albúmina de suero bovino o inmunoglobulina murina usando un agente de entrecruzamiento ha aumentado la actividad en comparación con la hormona de crecimiento no modificada. Los únicos agentes de entrecruzamiento mencionados en la patente son los compuestos de bajo peso molecular tales como carbodiimida o glutaraldehído. Sin embargo, tales agentes de entrecruzamiento de bajo peso molecular no garantizan composiciones homogéneas debido a sus enlaces no específicos, y pueden ser tóxicos *in vivo*. Además, esta patente reveló solamente el incremento de la actividad de una hormona de crecimiento por acoplamiento químico, pero no presentó el efecto del acoplamiento químico sobre la actividad sobre otros fármacos polipeptídicos, sin comprensión de la correlación con la estabilidad de proteínas tal como el incremento en la durabilidad y la semivida en suero.

Recientemente, los conjugados hechos entre polipéptidos fisiológicamente activos con una región Fc de inmunoglobulina y un polímero no peptídico se han introducido como formulaciones de acción prolongada que prometen fármacos proteicos tanto en la mínima reducción en la actividad como un incremento en la estabilidad, como se describe en el documento de Patente coreana N° 10-0567902 ("Physiologically active polypeptide conjugate having improved in vivo durability"), Patente coreana N° 10-0725315 ("Protein complex using an immunoglobulin fragment and method for the preparation thereof"), los documentos WO 2006/107124 A1 y WO 2010/011096 A2.

Según estos métodos, hGH se puede aplicar como el polipéptido fisiológicamente activo de modo que se puede preparar un conjugado de hGH de acción prolongada. Para que estos conjugados de hGH de acción prolongada se usen como fármacos, es esencial que el efecto medicinal *in vivo* de hGH se mantenga mientras lo suprime de experimentar cambios fisicoquímicos tales como desnaturalización, agregación, adsorción o hidrólisis inducida por luz, calor o impurezas en aditivos. En comparación con hGH, un conjugado hGH de acción prolongada es mayor en tamaño y peso molecular y, por tanto, es más difícil de estabilizar.

Generalmente, las proteínas tienen una semivida muy corta, y presentan desnaturalización, tal como la agregación de monómeros, precipitación por agregación, y adsorción sobre la superficie de los recipientes, tras la exposición a temperaturas inapropiadas, un interfaz agua-aire, alta presión, estrés físico o mecánico, disolventes orgánicos, combinación microbiana, etc. Una vez desnaturalizadas, las proteínas pierden sus propiedades fisicoquímicas inherentes y su actividad fisiológica. Puesto que la desnaturalización proteica es irreversible en la mayoría de los casos, es casi imposible para las proteínas desnaturalizadas recuperar sus propiedades inherentes.

Las proteínas absorbidas tienen tendencia a agregarse cuando se desnaturalizan. Las proteínas agregadas pueden actuar como materiales antigénicos cuando se inyectan dentro del cuerpo y, por lo tanto, se deben administrar proteínas que sean suficientemente estables. Se han estudiado diversos métodos para prevenir la desnaturalización de las proteínas (John Geigert, *J. Parenteral Sci. Tech.*, 43, N°5, 220-224, 1989, David Wong, *Pharm. Tech.* octubre, 34-48, 1997, Wei Wang., *Int. J. Pharm.*, 185, 129-188, 1999, Willem Norde, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 25, 267-340, 1986, Michelle y col., *Int. J. Pharm.* 120, 179-188, 1995).

Algunos fármacos proteicos adoptaron un proceso de liofilización para evitar los problemas de estabilidad. Sin embargo, los productos liofilizados se disuelven de manera inconveniente en disolventes para la inyección. Además, la liofilización requiere un liofilizador a gran escala, incrementando el coste de inversión en la producción de los fármacos proteicos. También se sugirió la pulverización de proteínas con un secador por pulverización para mantener la estabilidad de las proteínas, pero no es económicamente beneficioso debido a un bajo rendimiento. Además, la exposición a las altas temperaturas del secado por pulverización produce efectos secundarios negativos sobre las propias proteínas.

Se han estudiado los estabilizadores, que surgen como un planteamiento alternativo que supera estas limitaciones, debido a que cuando se añaden a soluciones de fármaco proteico, tienen la capacidad de suprimir los cambios fisicoquímicos de los fármacos proteicos y garantizan la eficacia medicinal *in vivo* incluso después de almacenamiento a largo plazo. La albúmina de suero humano se ha usado mucho como estabilizador para diversos fármacos proteicos, y se ha probado su actuación (Edward Tarelli y col., *Biologicals* (1998) 26, 331-346).

Cuando se administra con albúmina de suero humano, los pacientes corren el riesgo de estar expuestos a contaminantes biológicos o patógenos tales como micoplasma, priones, bacterias y virus debido que aunque el proceso usado para purificar la albúmina comprende la inactivación, el cribado o la revisión de tales contaminantes o patógenos biológicos, estos no se pueden eliminar o inactivar perfectamente. Por ejemplo, un proceso de cribado comprende la revisión de suero del donante para ciertos virus, pero la revisión no es siempre fiable. Particularmente, no se pueden detectar un número muy pequeño de ciertos virus, si están presentes.

Debido a sus diferencias químicas, se pueden inactivar gradualmente diferentes proteínas a diferentes tasas bajo diferentes condiciones durante el almacenamiento. Es decir, la extensión del plazo de almacenamiento mediante un estabilizador no es idéntica para diferentes proteínas. Por esta razón, los estabilizadores a usar varían en relación con las proteínas diana, la concentración y el tipo dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas diana. Al contrario de las expectativas, los estabilizadores, cuando se usan en combinación, pueden provocar efectos negativos debido a la competición e interacción entre los mismos. Además, puesto que la naturaleza o la concentración de las proteínas diana pueden cambiar durante el almacenamiento, los estabilizadores usados pueden proporcionar efectos diferentes de los deseados. Por tanto, se requieren una gran cantidad de esfuerzo y precauciones para estabilizar las proteínas en soluciones.

Particularmente, los conjugados de hGH de acción prolongada que se preparan mediante el enlace de la hGH peptídica fisiológicamente activa con regiones Fc de inmunoglobulina para mejorar la durabilidad y la estabilidad *in vivo* de hGH requieren composiciones especiales para estabilizar la proteína debido a que son bastante diferentes en el peso y tamaño molecular de la hGH típica.

La Publicación de Patente Internacional N° WO93/19776 describe una formulación líquida estable de hGH que comprende un tampón de pH 6,0 a aproximadamente 7,0, un aminoácido, manitol y opcionalmente un conservante

tal como alcohol bencílico. La Publicación de Patente Internacional N° WO94/03198 describe una formulación líquida estable que contiene hGH, un tampón de pH 6,0, un tensioactivo no iónico, un conservante y, opcionalmente, una sal neutra o manitol. El documento de Patente americana N° 6.448.225 describe una formulación líquida farmacéuticamente aceptable estable que contiene hGH, un tampón de pH 6,0, un tensioactivo no iónico y, opcionalmente, una sal neutra o manitol, sin requerimiento de glicina. El documento de Patente coreana N° 10-0537260 describe una formulación líquida estabilizada de hGH que contiene PEG, en lugar de un tensioactivo no iónico y un conservante, un tampón y un agente isotónico como principios activos debido a que los tensioactivos no iónicos y los conservantes causan que la hGH se desamine significativamente. El documento EP 0 938902 A1 describe una composición acuosa estable que comprende la hormona de crecimiento humano disuelta en una solución tamponada que contiene cloruro de benzalconio (pH=5,5 a 6,5, más preferiblemente 6). Dicha composición contiene además 0,05 a 0,5 % p/v de un tensioactivo no iónico para aumentar la estabilidad de la hormona. También contiene además manitol y/o una sal neutra como agentes de isotonicidad.

Sin embargo, hGH y una región Fc de inmunoglobulina, aunque ambas son péptidos o proteínas, tienen diferentes propiedades fisicoquímicas, y se requiere que ambas se estabilicen al mismo tiempo. Como se ilustró anteriormente, diferentes proteínas se pueden inactivar gradualmente a diferentes tasas bajo diferentes condiciones durante el almacenamiento debido a sus diferencias químicas. Al contrario de las expectativas, el uso de estabilizadores adecuados para su uso en la estabilización de péptidos o proteínas en combinación pueden provocar efectos negativos debido a la competición e interacción entre los mismos. Por lo tanto, con respecto a los conjugados de hGH de acción prolongada, las composiciones de sus formulaciones estables son diferentes de aquellas de las formulaciones para estabilizar hGH sola. De hecho, es muy difícil descubrir una formulación para estabilizar tanto hGH como una región Fc de inmunoglobulina.

Conduciendo a la presente invención, la investigación intensa y rigurosa sobre el almacenamiento seguro de conjugados de hGH de acción prolongada-Fc de inmunoglobulina durante un largo periodo de tiempo, conducida por los presentes inventores, dio como resultado el descubrimiento de que una composición estabilizadora que comprende un tampón de pH 5,0 a aproximadamente 6,0, un tensioactivo no iónico, un alcohol de azúcar y cloruro de sodio puede proporcionar una formulación líquida económicamente beneficiosa con un conjugado de hGH de acción prolongada que puede dar un gran estímulo al incremento de la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada durante el almacenamiento durante un largo periodo de tiempo sin preocupaciones sobre la contaminación vírica.

Descripción de la invención

Problema técnico

Por lo tanto, es el problema técnico de la presente invención proporcionar una formulación líquida de conjugado de hGH de acción prolongada que esté mejorada en la estabilidad de almacenamiento.

Solución al problema

De acuerdo con un aspecto del mismo, la presente invención proporciona una formulación líquida de conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada en el que la hormona de crecimiento humano está unida a una región Fc de inmunoglobulina, y un estabilizador libre de albúmina, comprendiendo dicho estabilizador un tampón de pH 5,0 a 6,0, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y cloruro de sodio, en la que dicho tensioactivo no iónico se usa en una cantidad de desde 0,001 a 0,05 % (p/v) basado en el volumen total de la formulación. De acuerdo con otro aspecto, la presente invención también proporciona un método para producir la anterior formulación líquida de conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada, comprendiendo dicho método: a) preparar un conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada; y b) combinar el conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada con un estabilizador libre de albúmina, comprendiendo dicho estabilizador un tampón con un pH de 5,0 a 6,0, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y cloruro de sodio, en el que dicho tensioactivo no iónico se usa en una cantidad de desde 0,001 a 0,05 % (p/v) basado en el volumen total de la formulación.

Como se usa en el presente documento, el término "conjugado de hGH de acción prolongada" pretende referirse a un conjugado en el que la hormona de crecimiento humano peptídica fisiológicamente activa está unida a una región Fc de inmunoglobulina y la actividad fisiológica de la cual es de duración incrementada en comparación con la hGH nativa.

El término "acción prolongada", como se usa en el presente documento, pretende significar que la actividad fisiológica tiene una duración mayor que la hGH nativa.

La hGH útil en la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos del tipo silvestre o un análogo muy relacionado que tiene una actividad similar a la del tipo silvestre. En la presente invención, se puede usar cualquier hGH, sea nativa o recombinante. Preferida es la hGH recombinante que se prepara usando *E. coli* como

hospedador. Siempre y cuando su actividad biológica no se cambie significativamente, se puede usar en la técnica cualquier mutante derivado de la hGH nativa mediante la sustitución, delección o inserción de restos de aminoácidos.

Con respecto a la Fc de inmunoglobulina útil en la presente invención, puede ser Fc de inmunoglobulina humana o su análogo muy relacionado o se puede originar de animales tales como vaca, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas, cobayas, etc. La región Fc de inmunoglobulina puede estar derivada de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM o sus combinaciones o híbridos. La región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc híbrida o diferentes dominios de inmunoglobulinas seleccionadas del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE y IgM, o puede ser un dímero o multímero de una inmunoglobulina de cadena sencilla que tiene dominios del mismo origen. Preferida es una región Fc derivada de IgG o IgM, que son aquellas que son las más abundantes en sangre humana, con la mayor preferencia para una región Fc derivada de IgG, conocida por mejorar la semivida en suero de las proteínas de unión a ligando. Fc de inmunoglobulina se puede obtener mediante el tratamiento de IgG nativa con una cierta proteasa o producida de una célula transformada usando tecnología de recombinación genética. Preferiblemente, la Fc de inmunoglobulina es una Fc de inmunoglobulina humana recombinante producida en *E. coli*.

IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la presente invención puede incluir sus combinaciones o híbridos. Preferidas son las subclases IgG2 e IgG4, y la más preferida es la región Fc de IgG4 que raramente tiene funciones efectoras tales como CDC (Citotoxicidad Dependiente de Complemento). Es decir, la región Fc de inmunoglobulina más adecuada como vehículo de fármaco de la presente invención es una región Fc aglicosilada derivada de IgG4. La región Fc derivada de humano es más preferible que una región Fc derivada de no humano, la cual puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunes indeseables tales como la producción de un nuevo anticuerpo frente al antígeno.

El conjugado de hGH de acción prolongada usado en la presente invención se puede preparar uniendo la hGH a una región Fc de inmunoglobulina producida por el método anteriormente mencionado. El método de unión se puede alcanzar por entrecruzamiento de hGH con una región Fc de inmunoglobulina por un polímero no peptídil o produciendo una proteína de fusión en la que la hGH se fusiona con una región Fc de inmunoglobulina usando recombinación genética. Preferido es un enlace entre hGH y una región Fc de inmunoglobulina por un polímero no peptídil.

El polímero no peptídil útil para el entrecruzamiento se puede seleccionar del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxitilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter, polímeros biodegradables tales como PLA (poli (ácido láctico) y PLGA (poli (ácido láctico-glicólico), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y una combinación de los mismos. El más preferido es el polietilenglicol. Sus derivados bien conocidos en la técnica y los derivados que se pueden preparar fácilmente usando un método conocido en la técnica también están dentro del alcance de la presente invención.

Para preparar conjugados de hGH de acción prolongada, la referencia se puede hacer al documento de Patente coreana N° 0725315. Los expertos en la técnica pueden producir los conjugados de hGH de acción prolongada de la presente invención con referencia a los documentos.

La formulación líquida del conjugado de hGH de acción prolongada de la presente invención comprende un conjugado de hGH de acción prolongada en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Generalmente, la cantidad farmacéuticamente eficaz de hGH corresponde a aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mg en un vial de uso único. El conjugado de hGH de acción prolongada usado en la presente invención oscila en la concentración de 1 mg/ml a 55 mg/ml y preferiblemente de 15 mg/ml a 25 mg/ml.

El término "estabilizador", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una sustancia que permite que el conjugado de hGH de acción prolongada sea almacenado establemente. El término "estabilización" significa la pérdida de menos de un cierto porcentaje de un principio activo, generalmente menos del 10 % y preferiblemente menos del 5 %. Una formulación se entiende que es estable cuando el conjugado de hGH de acción prolongada conserva su actividad a un nivel del 90 % o mayor que la actividad original y preferiblemente a un nivel de aproximadamente 92 a aproximadamente 95 % después del almacenamiento a 10 ± 3 °C durante dos años, 25 ± 2 °C durante seis meses o a 40 ± 2 °C durante una a dos semanas. Respecto a las proteínas tales como conjugados de hGH de acción prolongada, su estabilidad de almacenamiento es muy importante en suprimir que sus formas antigénicas sean potencialmente producidas así como en garantizar su dosis exacta.

Aunque se mantienen unidas por el conjugado de hGH de acción prolongada de la presente invención, las propiedades fisicoquímicas de la hGH peptídica fisiológicamente activa y la región Fc de inmunoglobulina son diferentes unas de otras y se deben estabilizar simultáneamente. Las diferencias fisicoquímicas entre las mismas pueden causar que diferentes péptidos o proteínas se inactiven gradualmente a respectivas tasas bajo diferentes condiciones durante el almacenamiento. Al contrario de las expectativas, el uso de estabilizadores adecuados para péptidos activos o proteínas en combinación pueden provocar un efecto negativo debido a que compiten o interactúan unos con otros.

Diseñado para estabilizar simultáneamente tanto la hGH peptídica fisiológicamente activa como una región Fc de

inmunoglobulina de manera que la actividad del conjugado de hGH de acción prolongada se pueda mantener al nivel deseado durante un largo periodo de tiempo, el estabilizador de la presente invención comprende un tampón con un pH de 5,0 a 6,0, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y cloruro de sodio.

5 Las funciones del tampón para mantener el pH de la solución dentro de un intervalo predeterminado para prevenir un marcado cambio de pH que puede conducir a la inactivación de la hGH de acción prolongada. Siempre y cuando se conozca en la técnica como un tampón de pH farmacéuticamente aceptable, cualquier tampón con un pH de 5,0 a 6,0 se puede usar en la presente invención. El tampón útil en la presente invención incluye una sal alcalina (fosfato de sodio o potasio o sus sales de hidrógeno o dihidrógeno), citrato de sodio/ácido cítrico, acetato de sodio/ácido acético, y una combinación de los mismos. Preferidos son un tampón de citrato y un tampón de fosfato, con una preferencia mayor para el tampón de citrato. El tampón de citrato útil en la presente invención puede contener citrato preferiblemente en una cantidad de desde 5 mM a 100 mM y más preferiblemente en una concentración de desde 10 mM a 50 mM.

15 Puesto que una reacción dentro de una solución puede variar dependiendo del pH del tampón en la solución, el pH del estabilizador es muy importante. El pH al que se da las reacciones y su efecto sobre la solubilidad difieren de una proteína a otra. Por lo tanto, es difícil estabilizar las proteínas de tal manera que mantengan la alta solubilidad y la estructura tridimensional exacta sin la generación de impurezas desnaturalizadas. Las formulaciones de hGH convencionales normalmente emplean un tampón con un pH de 6,0 a aproximadamente 7,0 o mayor para reducir la generación de impurezas e incrementar la solubilidad de la proteína.

El estabilizador de la presente invención comprende un tampón con un pH de 5,0 a aproximadamente 6,0, preferiblemente con un pH de 5,2 a aproximadamente 6,0, y más preferiblemente un pH de 5,2 a aproximadamente 5,5. En una realización de la presente invención, se midió después del almacenamiento durante tres meses que los contenidos de la impureza N°6 y N°7, correspondientes a impurezas desaminadas de hGH, se disminuyeron particularmente a un pH bajo (por ejemplo, pH 5,2) (Fig. 1). Estos datos indican que debido a que el conjugado de hGH de acción prolongada compuesto de hGH y región Fc de inmunoglobulina es diferente en propiedad de la hGH sola, la formulación líquida diseñada tanto para estabilizar el conjugado de hGH de acción prolongada como para incrementar la solubilidad del conjugado de hGH de acción prolongada debe ser diferente en pH de las formulaciones líquidas convencionales de hGH.

Además, el alcohol de azúcar actúa para incrementar la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada. En la presente invención, el alcohol de azúcar se usa preferiblemente en una cantidad de desde 1 a 10 % (p/v) y más preferiblemente en una cantidad de 5 % (p/v) basado en el volumen total de la formulación. Ejemplos del alcohol de azúcar útil en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, manitol, sorbitol y una combinación de los mismos. Como se entiende a partir de los datos de la Tabla 4, la adición de 0,5 % de L-Arg-HCl a manitol no tiene influencia sobre la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada.

El cloruro de sodio tiene el efecto de estabilizar más el conjugado de hGH de acción prolongada en solución así como de actuar como un agente isotónico que mantiene la presión osmótica apropiada cuando una solución del conjugado de hGH está siendo inyectando en el cuerpo.

En la formulación, el cloruro de sodio puede estar presente preferiblemente en una cantidad de desde 5 a 200 mM y más preferiblemente en una cantidad de 150 mM, y su contenido se puede ajustar según el tipo y la cantidad de los ingredientes de manera que la formulación sea isotónica.

En una realización de la presente invención, el conjugado de hGH de acción prolongada se evaluó para la estabilidad en formulaciones que comprenden un tampón con un pH de 5,0 a aproximadamente 6,0, un alcohol de azúcar y un tensioactivo no iónico en presencia o ausencia de cloruro de sodio. Como resultado, la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada se mantuvo a un nivel notablemente mayor cuando se almacenó a 25 °C durante cuatro semanas en una formulación que contenía 5 % de manitol en presencia de NaCl, particularmente NaCl 150 mM que en ausencia de NaCl (Tabla 2). Al contrario de la hGH convencional, el conjugado de hGH de acción prolongada según la presente invención se puede estabilizar en una formulación que contiene 1 a aproximadamente 10 % (p/v) de alcohol de azúcar al y NaCl 5 a aproximadamente 200 mM y estabilizar además en una formulación que contiene un tampón con un pH de 5,0 a aproximadamente 6,0, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y cloruro de sodio.

El tensioactivo no iónico reduce la tensión superficial de la solución proteica para prevenir la absorción o la agregación de las proteínas sobre una superficie hidrófoba. Ejemplos del tensioactivo no iónico útil en la presente invención incluyen polisorbato, poloxámeros y sus combinaciones, con preferencia por los polisorbato. Entre los tensioactivos no iónicos de polisorbato están polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80. Preferido es el polisorbato 80.

Según una realización de la presente invención, se observó que la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada se incrementa en presencia de polisorbato 80 (Tabla 8). La estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada era el mismo cuando se usó el polisorbato 20 en lugar de polisorbato 80 hasta que habían pasado dos

semanas, pero después del almacenamiento durante cuatro semanas, hay una diferencia significativa en la estabilidad entre los mismos aunque los tensioactivos son muy similares unos a otros.

En la formulación líquida de la presente invención, el tensioactivo no iónico está contenido en una cantidad de desde 0,001 a 0,05 % (p/v), y más preferiblemente en una cantidad de 0,005 % (p/v). Norditropin, una formulación líquida de hGH comercialmente disponible de Nordisk, emplea 3 mg/ml de Poloxámero 188 como tensioactivo (Tabla 9). Según una realización de la presente invención, se observó que los conjugados de hGH de acción prolongada en la formulación que contenían 3 mg/ml de poloxámero 188 se agregaban después del almacenamiento a 25 °C durante dos semanas (Tabla 8). Estos datos implican que el tipo y la concentración del tensioactivo, que actúa como estabilizador para los fármacos proteicos, deben ser específicos al fármaco.

En una realización de la presente invención, se encontró que una formulación que contenía de 1 a aproximadamente 10 % (p/v) de alcohol de azúcar y 5 a aproximadamente 200 mM de NaCl además de un tampón de pH 5,2 y un tensioactivo no iónico en una cantidad de desde 0,001 a 0,05 % (p/v), basado en el volumen total de la formulación, incrementaba significativamente la estabilidad de almacenamiento del conjugado de hGH de acción prolongada, indicando que una combinación de un tampón de pH 5,2, un tensioactivo no iónico, un alcohol de azúcar y cloruro de sodio muestra un efecto sinérgico sobre la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada.

El estabilizador de la presente invención no contiene albúmina. Debido a que es producido a partir de suero humano, existe siempre la posibilidad de que la albúmina de suero humano disponible como estabilizador para proteínas pueda estar contaminada con virus patógenos de origen humano. La gelatina o la albúmina de suero bovino pueden causar enfermedades o pueden tender tendencia a inducir una respuesta alérgica en algunos pacientes. Libre de proteínas heterólogas tales como albúminas de suero de origen humano o animal o gelatina purificada, el estabilizador de la presente invención no tiene posibilidad de causar contaminación vírica.

Además del tampón de pH 5,0 a aproximadamente 6,0, el cloruro de sodio, el alcohol de azúcar y el tensioactivo no iónico en la cantidad reclamada, la formulación líquida de la presente invención puede comprender además ingredientes o materiales bien conocidos en la técnica a menos que degraden el efecto de la presente invención. Por ejemplo, la formulación de la presente invención puede comprender además azúcares, polialcoholes o aminoácidos neutros.

Ejemplos preferibles de los azúcares que además pueden estar contenidos en la formulación para incrementar la estabilidad de almacenamiento del conjugado de acción prolongada incluyen monosacáridos tales como manosa, glucosa, fucosa y xilosa, y polisacáridos tales como lactosa, sacarosa, rafinosa y dextrano. Entre los polialcoholes que se pueden usar además en la presente invención están propilenglicol, polietilenglicol de bajo peso molecular, glicerol, polipropilenglicol de bajo peso molecular, y una combinación de los mismos. Basándose en el volumen total de la formulación, cada uno del azúcar y el polialcohol se pueden usar en una cantidad de desde 1 a 10 % (p/v) y preferiblemente en una cantidad de 5 % (p/v).

Según una realización preferida de la misma, la presente invención proporciona una formulación líquida que comprende un tampón de Na-citrato 20 mM (pH 5,2 a aproximadamente 6,0), NaCl 5 a aproximadamente 200 mM, 1 a aproximadamente 10 % (p/v) de manitol, y 0,001 a aproximadamente 0,05 % de polisorbato 80. En una realización de la presente invención, una formulación líquida del conjugado de hGH de acción prolongada que comprende tampón de Na citrato, pH 5,2, 5 % (p/v) de manitol, NaCl 150 mM y 0,005 % (p/v) de polisorbato 80 se comparó con Norditropin, una formulación de hGH comercialmente disponible de Nordisk. La formulación líquida del conjugado de hGH de acción prolongada de la presente invención presentó estabilidad de almacenamiento tan alta como o mayor que la de Norditropin (Tabla 10). En un ensayo para la estabilidad de almacenamiento a largo plazo según otra realización, se encontró que la formulación líquida del conjugado de hGH de acción prolongada de la presente invención mantenía la actividad del conjugado de hGH de acción prolongada a niveles altos durante seis semanas (Tabla 11).

Al no tener daño concomitante de contaminación vírica así como al ser simple y tener excelente estabilidad de almacenamiento, la formulación líquida libre de albúmina del conjugado de hGH de acción prolongada de la presente invención, que está diseñada para proporcionar estabilidad para el conjugado de hGH de acción prolongada, tiene un beneficio económico en comparación con otros estabilizadores o agentes de liofilización.

Además, debido a que comprende un conjugado de hGH de acción prolongada que tiene mayor durabilidad *in vivo* que la forma nativa, la formulación líquida de la presente invención deja que la actividad de la proteína se mantenga a altos niveles durante un largo período de tiempo, en comparación con las formulaciones de hGH típicas y, por tanto, se pueden usar como formulación de fármaco eficaz.

Efectos ventajosos de la invención

La formulación líquida del conjugado de hGH que comprende un tampón de pH 5,0 a aproximadamente 6,0, un alcohol de azúcar, cloruro de sodio y un tensioactivo no iónico de acuerdo con la presente invención está libre de albúmina de suero humano y otros factores peligrosos que están potencialmente contaminados con virus, y pueden

proporcionar excelente estabilidad de almacenamiento personalizada para un conjugado de hGH de acción prolongada compuesto de un polipéptido de hGH y una región Fc de inmunoglobulina que tiene mayor peso molecular y durabilidad *in vivo*, en comparación con la nativa.

5 Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetivos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos acompañantes, en los cuales;

- 10 La Fig. 1 es un cromatograma de IE-HPLC representativo obtenido después de que se analizara la estabilidad en un conjugado de hGH de acción prolongada por IE-HPLC durante su almacenamiento a 4 °C durante tres meses en un tampón a diversos valores de pH como se describe en el Ejemplo 4; y
 15 La Fig. 2 es un gráfico obtenido después de analizar la estabilidad de un conjugado de hGH de acción prolongada con IE-HPLC durante su almacenamiento a 4 °C durante seis meses en un tampón a un pH de 5,2 como se describe en el Ejemplo 7.

Modo para la invención

- 20 Se puede obtener un mejor entendimiento de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se muestran para ilustrar, pero no se construyen como limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1. Preparación de conjugado de hGH de acción prolongada

- 25 ALD-PEG-ALD (IBD), el cual es un polietilenglicol de 3,4 kDa con un grupo aldehído en cada extremo, se conjugó con hGH (Pm 22 kDa) y, a continuación, se unió al terminal N de una región Fc aglicosilada derivada de IgG4 humana (Pm 50 kDa), seguido de purificación para proporcionar un conjugado hGH-PEG-Fc.

Ejemplo 2. Ensayo del conjugado de hGH de acción prolongada para la estabilidad en presencia o ausencia de cloruro de sodio

- 30 Para evaluar la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada en la formulación que comprende un tampón, un alcohol de azúcar y un tensioactivo no iónico en presencia o ausencia de cloruro de sodio, el conjugado de hGH de acción prolongada se almacenó a 25 °C durante cuatro semanas en la formulación de la Tabla 1 de más adelante y, a continuación, se analizó su estabilidad usando cromatografía de intercambio iónico (IEC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). En la formulación, se usó tampón de citrato como el tampón, manitol como el alcohol de azúcar, y polisorbato 80 como el tensioactivo no iónico. En la Tabla 2, IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) se representa por (% de Área/% de Área de inicio), mostrando la pureza residual del conjugado de hGH de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

40 Tabla 1

[Tabla 1]					
Nº	Conc.	Tampón	Sal	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
1	19,5 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5,2)	NaCl 150 mM	5 % Manitol	0,005 % Polisorbato 80
2	19,5 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5,2)	-	5 % Manitol	0,005 % Polisorbato 80

Tabla 2

45

[Tabla 2]								
Nº	IE-HPLC (%)				SE-HPLC (%)			
	Inicio	1 semana	2 semanas	4 semanas	Inicio	1 semana	2 semanas	4 semanas
1	100	94,5	92,5	85,0	100	98,5	98,4	93,9
2	100	94,7	90,7	80,9	100	98,9	98,1	93,6

- 50 Como se entiende a partir de los datos, la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada se mantenía a un nivel extraordinariamente mayor cuando se almacenaba a 25 °C durante cuatro semanas en una formulación que contenía 5 % de manitol en presencia de NaCl, particularmente NaCl 150 mM, en comparación con en ausencia de NaCl (lo cual no es según la invención).

Ejemplo 3 Ensayo del conjugado de hGH de acción prolongada para la estabilidad en relación con alcohol de azúcar

55

Durante el almacenamiento de la hGH de acción prolongada en una formulación que comprende un tampón como estabilizador, NaCl como agente isotónico, un tensioactivo no iónico, y un alcohol de azúcar, se examinó el efecto

del alcohol de azúcar sobre la estabilidad de la hGH de acción prolongada.

En la formulación, se usó un tampón de ácido cítrico (citrato de sodio, pH 5,2) como el tampón, manitol o sorbitol como el alcohol de azúcar, y polisorbato 80 como el tensioactivo no iónico.

El conjugado de hGH de acción prolongada se almacenó a 25 °C durante cuatro semanas en las formulaciones de la Tabla 3 de más adelante y, a continuación, se analizó su estabilidad usando cromatografía de intercambio iónico (IEC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). En la Tabla 4, IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) se representa por (% de Área/% de Área de inicio), mostrando la pureza residual del conjugado de hGH de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

Tabla 3

[Tabla 3]

Nº	Conc.	Tampón	Sal	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
1	19,5 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5,2)	NaCl 150 mM	5 % Manitol	0,005 % Polisorbato 80
2	19,5 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5,2)	NaCl 150 mM	5 % Sorbitol	0,005 % Polisorbato 80
3	19,5 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5,2)	NaCl 150 mM	5 % Manitol 10,5 % Arg-HCl	0,005 % Polisorbato 80

Tabla 4

[Tabla 4]

Nº	IE-HPLC (%)				SE-HPLC (%)			
	Inicio	1 semana	2 semanas	4 semanas	Inicio	1 semana	2 semanas	4 semanas
1	100	98,8	97,6	94,7	100	96,0	100	99,9
2	100	98,6	97,4	94,6	100	100	99,9	99,9
3	100	98,8	97,8	94,6	100	99,6	99,4	99,3

Como se puede ver en las tablas anteriores, la estabilidad de los alcoholes de azúcar manitol y sorbitol era similar. Además, la adición de 0,5 % de L-Arg-HCl a manitol no tenía influencia sobre la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada.

Ejemplo 4. Ensayo del conjugado de hGH de acción prolongada para la estabilidad en relación con el pH del tampón

La estabilidad de la hGH de acción prolongada se evaluó en un tampón a diversos valores de pH. En este contexto, el conjugado de hGH de acción prolongada se almacenó a 4 °C durante tres meses en las formulaciones de la Tabla 5 de más adelante y, a continuación, se analizó su estabilidad usando cromatografía de intercambio iónico (IEC). En la Tabla 6, IE-HPLC (%) se representa como (% de Área/% de Área de inicio), mostrando la pureza residual del conjugado de hGH de acción prolongada y las impurezas en comparación con la pureza inicial como un pico principal y picos de impureza, respectivamente (Fig. 1).

Tabla 5

[Tabla 5]

Nº	Conc.	Tampón	Sal	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
1	19,5 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5,2)	NaCl 150 mM	5 % Manitol	0,005 % Polisorbato 80
2	19,5 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5,5)	NaCl 150 mM	5 % Manitol	0,005 % Polisorbato 80
3	19,5 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 6,0)	NaCl 150 mM	5 % Manitol	0,005 % Polisorbato 80

Tabla 6

[Tabla 6]

Nº	Tiempo	IE-HPLC (%)										
		Nº1	Nº2	Nº3	Nº4	Nº5	Pico principal	Nº6	Nº7	Nº8	Nº9	Nº10
1	0M	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	96,6	1,4	1,5	0,3	0,1	0,1
	2M	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	93,6	2,3	3,1	0,3	0,0	0,1
	3M	0,1	0,2	0,1	0,4	0,0	92,7	1,9	3,8	0,4	0,0	0,2
2	0M	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	96,5	1,4	1,6	0,3	0,1	0,1
	2M	0,1	0,4	0,1	0,0	0,0	93,9	2,1	3,0	0,3	0,1	0,2
	3M	0,1	0,2	0,0	0,2	0,0	92,4	2,1	4,2	0,5	0,0	0,1

Nº	Tiempo	IE-HPLC (%)										
		Nº1	Nº2	Nº3	Nº4	Nº5	Pico principal	Nº6	Nº7	Nº8	Nº9	Nº10
3	0M	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	96,2	1,4	1,8	0,3	0,1	0,2
	2M	0,1	0,4	0,1	0,0	0,0	93,8	2,0	3,3	0,3	0,0	0,1
	3M	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	92,3	2,1	4,7	0,4	0,0	0,1

Después del almacenamiento durante tres meses, los contenidos de la impureza Nº6 y Nº7 se disminuyeron a pH 5,2, en comparación con pH 5,5 y pH 6,0, demostrando que la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada en el tampón con un pH de 5,2 estaba mejorado (Fig. 1). Las impurezas se analizaron mediante mapeo de péptido, seguido de determinación de los pesos moleculares por LC-MS/MS. Se determinó que la impureza Nº6 y Nº7 eran impurezas desaminadas.

Ejemplo 5. Ensayo del conjugado de hGH de acción prolongada para la estabilidad en relación con el tensioactivo no iónico

Después de ser almacenado a 25 °C durante cuatro semanas en una formulación que comprendía el tensioactivo no iónico polisorbato 80 o 20, o poloxámero 188 como estabilizador, se ensayó la estabilidad de la hGH de acción prolongada usando SEC y IEC. En la formulación, como se ve en la Tabla 7, se usaron tampón de ácido cítrico de pH 5,2 y manitol como el tampón y el alcohol de azúcar, respectivamente. En la Tabla 8, IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) revelaron la pureza residual del conjugado de hGH de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

Tabla 7

[Tabla 7]

Nº	Conc.	Tampón	Sal	Alcohol de azúcar	Tensioactivo
1	19,5 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5,2)	NaCl 150 mM	5 % Manitol	0,05 mg/ml Polisorbato 80
2	19,5 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5,5)	NaCl 150 mM	5 % Manitol	3 mg/ml Poloxámero 188
3	19,5 mg/ml	Na-Citrato 20 mM (pH 5,2)	NaCl 150 mM	5 % Manitol	2 mg/ml polisorbato 20

*0,05 mg/ml de Polisorbato 80 corresponde a 0,005 % de polisorbato 80.

Tabla 8

[Tabla 8]

Nº	IE-HPLC (%)				SE-HPLC (%)			
	Inicio	1 semana	2 semanas	4 semanas	Inicio	1 semana	2 semanas	4 semanas
1	100	98,0	96,4	93,3	100	99,6	99,5	99,3
2	100	98,3	85,8	N/D ^A	100	100	95,3	N/D ^A
3	100	98,3	96,4	84,8	100	99,7	99,9	96,3

^Alos datos no están disponibles debido a la precipitación por agregación

Como se entiende a partir de los datos, se observó que la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada se incrementa en presencia de polisorbato 80. En el caso de polisorbato 20, no se detectaron diferencias del polisorbato 80 en la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada hasta dos semanas, pero después del almacenamiento durante cuatro semanas, había una diferencia significativa en la estabilidad entre los mismos aunque no eran muy similares unas de otras. Además, el conjugado de hGH de acción prolongada se agregó después del almacenamiento a 25 °C durante dos semanas en la formulación que contenía 2 mg/ml de poloxámero 188. Las formulaciones 2 y 3 no eran de acuerdo con la invención.

Ejemplo 6. Comparación de la estabilidad entre el conjugado de hGH de acción prolongada líquido y el fármaco comercialmente disponible Norditropin

La capacidad de estabilización de la formulación compuesta de tampón de citrato de pH 5,2, NaCl, manitol y polisorbato 80, finalmente seleccionado a través de los ensayos de estabilidad de los Ejemplos 2 a 5, se evaluó mediante la comparación con la formulación de hGH líquida comercialmente disponible Norditropin (Novo Nordisk). Norditropin tiene una concentración de 10 mg/ml y sus ingredientes se dan en la Tabla 9, de más adelante. Se almacenaron a 25 °C durante cuatro semanas. Para confirmar una diversidad de cargas, Norditropin se ensayó usando electroforesis capilar (CE) y SEC como se describe en la Farmacopea Europea. Por otro lado, el conjugado de hGH de acción prolongada de la presente invención se analizó usando IEC y SEC, que son similares en principio al ensayo CE. Los resultados se dan en la Tabla 10, de más adelante. CE (%), o IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) muestran la pureza residual del conjugado de hGH de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

Tabla 9

[Tabla 9]

Formulación	Conc.	Tampón	Sal y otros	Alcohol de azúcar y otros	Tensioactivo
Norditropin	10 mg/ml	-	3 mg/ml fenol	1,13 mg/ml histidina 38,7 mg/ml de manitol	3 mg/ml poloxámero 188
hGH de acción prolongada	19,5 mg/ml (6 mg/ml hGH)	Na-Citrato 20 mM (pH 5,2)	NaCl 150 mM	5 % Manitol	0,005 % Polisorbato 80

5 Tabla 10

[Tabla 10]

Nº	CE (%) o IEC (%)				SEC (%)			
	Inicio	1 semana	2 semanas	4 semanas	Inicio	1 semana	2 semanas	4 semanas
Norditropin	100	98,2	95,9	91,5	100	100	100,1	100
hGH de acción prolongada	100	98,0	96,4	93,3	100	99,6	99,5	99,3

10 Como se puede ver, la formulación de la presente invención garantizó la estabilización de la hGH a un nivel tan alto como o mayor que el que puede la formulación de hGH comercialmente disponible. Estos resultados demuestran que la formulación líquida de hGH de acción prolongada de la presente invención puede proporcionar excelente estabilidad de almacenamiento para hGH.

15 **Ejemplo 7. Ensayo del conjugado de hGH de acción prolongada líquido para la estabilidad de almacenamiento a largo plazo**

Para evaluar la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de la formulación líquida compuesta de tampón de ácido cítrico de pH 5,2, NaCl, manitol y polisorbato 80, se analizaron las muestras para la estabilidad después del almacenamiento a 4 °C durante seis meses en la formulación. Los resultados se dan en la Fig. 2 y la Tabla 11. IE-HPLC (%), SE-HPLC (%), y contenidos de proteína (%) revelan la pureza residual del conjugado de hGH de acción prolongada en comparación con la pureza inicial.

Tabla 11

25

[Tabla 11]

Ensayo de estabilidad de almacenamiento a largo plazo (almacenamiento a 4 °C)									
Periodo de almacenamiento	Propiedad	pH	Ensayo de identificación		Ensayo de purificación			Contenido de proteína (%)	Actividad biológica
			IE-HPLC	Transferencia Western	SDS-PAGE	IE-HPLC (%)	SE-HPLC (%)		
Inicio	Incoloro	5,3	Confirmada	Confirmada	Confirmada	100,0	100,0	100,0	Confirmada
1 mes	Incoloro	5,3	Confirmada	Confirmada	Confirmada	98,5	99,9	104,2	Confirmada
3 meses	Incoloro	5,3	Confirmada	Confirmada	Confirmada	98,5	100,0	104,5	Confirmada
6 meses	Incoloro	5,3	Confirmada	Confirmado	Confirmada	97,2	99,3	101,9	Confirmada

Se observó que el conjugado de hGH de acción prolongada de la presente invención estaba estable durante más de 6 meses en la formulación líquida.

30

REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida de conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada en la que la hormona de crecimiento humano está unida a una región Fc de inmunoglobulina, y un estabilizador libre de albúmina, comprendiendo dicho estabilizador un tampón de pH 5,0 a aproximadamente 6,0, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y cloruro de sodio, en la que se usa dicho tensioactivo no iónico en una cantidad de desde 0,001 a 0,05 % (p/v) basado en el volumen total de la formulación.
2. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que el alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol y una combinación de los mismos.
3. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que el alcohol de azúcar se usa en una cantidad de 1 a 10 % (p/v) basado en el volumen total de la formulación.
4. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que el tampón es un tampón de citrato o fosfato.
5. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que el tampón oscila en pH de 5,2 a 6,0.
6. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que el tampón oscila en pH de 5,2 a 5,5.
7. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que el cloruro de sodio se usa en una concentración de 5 a 200 mM.
8. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que el tensioactivo no iónico es polisorbato 80.
9. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que el estabilizador comprenda además uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en un azúcar, un polialcohol y un aminoácido.
10. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que el conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada comprende la hormona de crecimiento humano y una región Fc de inmunoglobulina con un enlace por un polietilenglicol, y el estabilizador comprende un tampón de citrato con un pH de 5,2 a 6,0, 1 a aproximadamente 10 % (p/v) de manitol, 0,001 a aproximadamente 0,05 % de polisorbato 80, y NaCl 5 a aproximadamente 200 mM.
11. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que la hormona de crecimiento humano tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la de una hormona de crecimiento humano nativa.
12. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que la región Fc de inmunoglobulina se deriva de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.
13. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 12, en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc híbrida de diferentes dominios de inmunoglobulinas seleccionadas del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE y IgM.
14. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 12, en la que la región Fc de inmunoglobulina es un dímero o multímero de una inmunoglobulina de cadena única que tiene dominios del mismo origen.
15. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 12, en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4.
16. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento de acción prolongada humano de la reivindicación 15, en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4 humana aglicosilada.
17. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 1, en la que el conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada comprende una hormona de crecimiento humano y una región Fc de inmunoglobulina con un enlace por un polímero no peptídico.

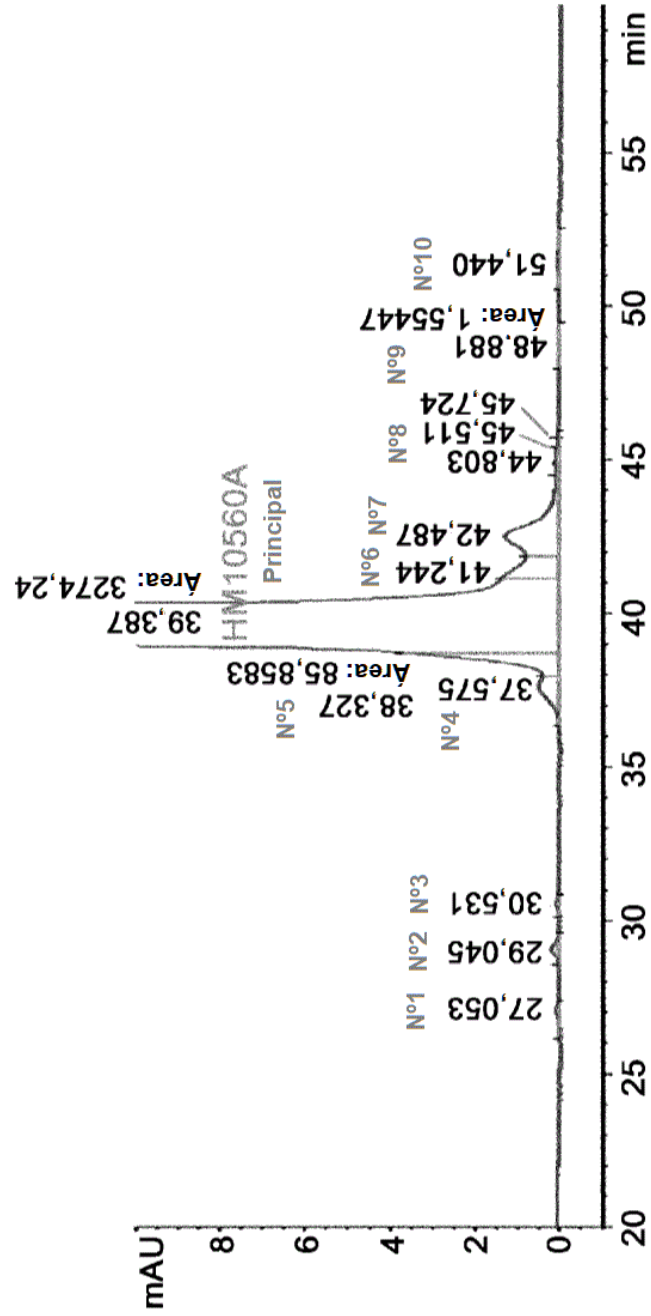
18. La formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada de la reivindicación 17, en la que el polímero no peptídico se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter, ácido poliláctico (PLA), PLGA (ácido poliláctico-glicólico), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y una combinación de los mismos.

19. Un método para la producción de la formulación líquida del conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada como en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:

- 10 a) preparar un conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada; y
- b) combinar el conjugado de hormona de crecimiento humano de acción prolongada con un estabilizador libre de albúmina, comprendiendo dicho estabilizador un tampón con un pH de 5,0 a aproximadamente 6,0, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico y cloruro de sodio, en el que dicho tensioactivo no iónico se usa en una cantidad de desde 0,001 a 0,05 % (p/v) basado en el volumen total de la formulación

15

[Fig. 1]



[Fig. 2]

