

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 520**

51 Int. Cl.:

A61K 47/40 (2006.01)

A61K 38/25 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2014** **PCT/CA2014/050134**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014** **WO14131122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2014** **E 14756414 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018** **EP 2961432**

54 Título: **Formulaciones de moléculas del factor de liberación de hormonas del crecimiento (GRF) con estabilidad mejorada**

30 Prioridad:

01.03.2013 US 201361771244 P
14.03.2013 US 201313803712

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.08.2018

73 Titular/es:

THERATECHNOLOGIES INC. (100.0%)
2015 Peel Street, 5th Floor
Montreal, QC H3A 1T8, CA

72 Inventor/es:

SHINGEL, KIRILL y
FLEURY, DANIEL

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones:

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

ES 2 679 520 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

Formulaciones de moléculas del factor de liberación de hormonas del crecimiento (GRF) con estabilidad mejorada

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas de moléculas de GRF, así como a métodos de preparación de dichas formulaciones farmacéuticas y usos de las mismas. Adicionalmente, la presente invención se refiere a métodos para estabilizar una molécula de GRF.

10

TÉCNICA ANTECEDENTE

La glándula pituitaria segrega la hormona del crecimiento (GH) o la somatotropina. Su actividad es fundamental para el crecimiento lineal de un organismo joven, pero también para el mantenimiento de la integridad en su estado
15 adulto. La GH actúa directa o indirectamente sobre los órganos periféricos al estimular la síntesis de factores de crecimiento (factor de crecimiento insulínico I o IGF-I) o de sus receptores (factor de crecimiento epidérmico o EGF). La acción directa de la GH es del tipo denominado anti-insulínico, lo que favorece la lipólisis a nivel de los tejidos adiposos. A través de su acción sobre la síntesis y secreción de IGF-I (somatomedina C), la GH estimula el crecimiento del cartílago y los huesos (crecimiento estructural), la síntesis de proteínas y la proliferación celular en
20 múltiples órganos periféricos, incluidos los músculos y la piel. En adultos, la GH participa en el mantenimiento de un estado de anabolismo proteico y desempeña un papel principal en el fenómeno de regeneración de tejido después de un trauma.

La secreción de GH por la glándula pituitaria está controlada principalmente por dos péptidos hipotalámicos, somatostatina y factor de liberación de la hormona del crecimiento (GRF, también conocida como hormona liberadora de GH o GHRH). La somatostatina inhibe su secreción, mientras que el GRF la estimula. El GRF humano es un péptido de 44 aminoácidos. Un péptido que consiste en los primeros 29 aminoácidos de GRF humano (hGRF₍₁₋₂₉₎; sermorelina) conserva la actividad biológica del péptido de longitud completa (Lance, V.A. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 1984, 119: 265-272) y se ha usado clínicamente para el
30 tratamiento de la deficiencia de GH en niños (Thorner, M. et al., Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1996, 81: 1189-1196). Más recientemente, se ha evaluado el potencial de GRF para revertir el declive relacionado con la edad en la función del eje (IGF)-I somatotrófico del factor de crecimiento GH-insulínico (Khorram, O. et al., Clinical Obstetrics and Gynecology 2001, 44: 893-901).

Entre todas las moléculas de GRF conocidas, los análogos de GRF que contienen una cola hidrófoba como se define en la presente solicitud son versiones modificadas o análogos de GRF humano que se ha demostrado que tienen una mayor estabilidad proteolítica en el medio biológico y como resultado, se muestran estos análogos para mostrar una mayor duración de acción que da como resultado una secreción de hormona del crecimiento potenciada y una síntesis del factor de crecimiento 1 de tipo insulínico (Patentes de Estados Unidos N.º 5.861.379 y 5.939.386).
40 Debido a su estabilidad plasmática superior y propiedades farmacológicas en comparación con la amida GRF (1-44) nativa, se demostró que estos análogos de GRF confieren eficacia terapéutica en varias afecciones médicas, por ejemplo, desgaste asociado con fibrosis quística y EPOC (Solicitud Internacional N.º WO 05/037307), recuperación después de una fractura de cadera, fragilidad en la población anciana, potenciación de la respuesta inmune y lipodistrofia asociada al VIH (Patente de Estados Unidos N.º 7.316.997).

45

La Solicitud de patente US 2008/249017 se refiere a la mejora de la estabilidad física de las moléculas GRF durante las etapas de fabricación, el almacenamiento a largo plazo y la manipulación antes de la administración. En particular, este documento describe una formulación farmacéutica líquida para inyección que comprende 1-8 mg/ml de [trans-3-hexenol]hGRF (1-44) amida, en la que dicha formulación es isotónica y tiene un pH de 5,0-6,0, y en el
50 que dicha formulación también comprende un tensioactivo aniónico y un agente no reductor.

La Patente CA 1 328 634 se refiere a la solubilización y estabilidad física de polipéptidos. Este documento describe composiciones solubilizadas y estabilizadas para inyección que comprenden un polipéptido y del 0,2 al 60 % (p/v) de un compuesto de ciclodextrina sustituido tal como beta-hidroxipropil ciclodextrina.

55

En términos prácticos, es muy importante conservar la integridad física y química de un compuesto peptídico de interés farmacéutico durante su proceso de fabricación, manipulación posterior, almacenamiento y uso del paciente. La pérdida de eficacia y potencia biológica se ha asociado con cambios en la integridad física (por ejemplo, agregación, desnaturalización, cambios en las estructuras secundarias y de orden superior) y química (por ejemplo,

oxidación, desamidación, isomerización de aminoácidos individuales).

Algunos problemas de desnaturalización son específicos de ciertos aminoácidos o ciertas secuencias de aminoácidos tales como proteólisis, degradación enzimática, oxidación, desnaturalización relacionada con el pH, etc.

- 5 Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar formulaciones mejoradas de moléculas de GRF, así como también para mejorar la retención de su bioactividad después del almacenamiento a largo plazo.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 10 La presente invención se refiere a formulaciones o composiciones farmacéuticas de una molécula de GRF, a métodos de preparación de las mismas y a usos de las mismas. La presente invención proporciona una formulación farmacéutica líquida que comprende:

- 15 una molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que la molécula de GRF es [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida, y una β -ciclodextrina modificada, a una concentración del 5 % al 10 % (p/v), en la que dicha formulación tiene un pH de 5,5 a 6,5 y en la que dicha β -ciclodextrina no está conjugada con dicha molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. El análogo de GRF es (hexenoil trans-3)hGRF(1-44)NH₂ (SEQ ID NO: 7).

- 20 En una realización, la formulación mencionada anteriormente está liofilizada o deshidratada.

- En una realización, la β -ciclodextrina modificada mencionada anteriormente es una alquil- o hidroxialquil- β -ciclodextrina. En una realización adicional, la alquil- o hidroxialquil- β -ciclodextrina es una alquil (C₁-C₆)- o hidroxialquil (C₁-C₆)- β -ciclodextrina. En una realización adicional, la β -ciclodextrina modificada es hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD). En otra realización, la β -ciclodextrina es metil- β -ciclodextrina (M- β -CD).

- En una realización, la ciclodextrina mencionada anteriormente está presente a una concentración de aproximadamente el 7,5 a aproximadamente el 10 % (p/v), o aproximadamente el 5, 7,5, 10 % (p/v).

- 30 En una realización, la formulación mencionada anteriormente tiene un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,2, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,5, de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2, de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,0, o aproximadamente 5,5, 5,8, 6,0 o 6,2. La presente invención proporciona una formulación farmacéutica líquida que comprende:

- 35 - [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida (SEQ ID NO: 7) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en una cantidad de 1 mg/ml a 8 mg/ml, y
- una β -ciclodextrina modificada a una concentración del 5 al 10 % (p/v),

- 40 en la que dicha formulación tiene un pH de 5,5 a 6,5 y en la que dicha β -ciclodextrina modificada no está conjugada con dicha [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

- En una realización, la formulación mencionada anteriormente tiene una tonicidad de aproximadamente 250 a aproximadamente 350 mOsm/l.

- 45 En una realización, la formulación mencionada anteriormente comprende además un agente de carga, en una realización adicional el agente de carga es manitol, sacarosa, glicina, metionina o una combinación de los mismos. En una realización, el agente de carga está presente en una cantidad de hasta aproximadamente el 5 % (p/v). En una realización, el agente de carga es manitol, en realizaciones adicionales, el manitol está presente en una
50 cantidad de aproximadamente el 2,5, 3,5, 4,0, 4,3, 4,7 o 5,0 % (p/v).

- En una realización, la formulación mencionada anteriormente comprende además un agente antimicrobiano. En una realización, el agente antimicrobiano es m-cresol, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, fenol o una combinación de los mismos. En una realización adicional, el agente antimicrobiano es m-cresol. En una realización adicional, el
55 agente antimicrobiano es alcohol bencílico. En una realización, el agente antimicrobiano está presente en una cantidad de hasta aproximadamente el 0,9 % (p/v), en realizaciones adicionales en una cantidad de hasta aproximadamente el 0,6 % (p/v) o hasta aproximadamente el 0,3 % (p/v). En otra realización más, el agente antimicrobiano está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 o el 0,30 % (p/v).

En una realización, la formulación mencionada anteriormente comprende adicionalmente un tampón, en una realización adicional un tampón de lactato, un tampón de acetato, un tampón de glutamato, un tampón de aspartato, un tampón de glicina o una combinación de los mismos.

- 5 En una realización, la molécula de GRF mencionada anteriormente o sal farmacéuticamente aceptable de la misma está presente en una cantidad de 1 a 8 mg/ml, en realizaciones adicionales en una cantidad de aproximadamente 4 a 8 mg/ml, aproximadamente de 6 a 8 mg/ml, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 mg/ml, más particularmente aproximadamente 6 mg/ml u 8 mg/ml.
- 10 En una realización, la formulación mencionada anteriormente comprende: [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida, del 5 al 10 % (p/v) de una β -ciclodextrina modificada, en donde la β -ciclodextrina modificada es hidroxipropil- β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina, o una combinación de las mismas, teniendo la formulación un pH de 5,5 a aproximadamente 6,0, más particularmente 6,0.
- 15 En una realización, la formulación mencionada anteriormente comprende: [trans-3-hexenoil]hGHRH (1-44) amida, del 5 al 10 % (p/v) de una β -ciclodextrina modificada, en donde la β -ciclodextrina modificada es hidroxipropil- β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina, o una combinación de las mismas, teniendo la formulación un pH de 5,5 a aproximadamente 6,0, más particularmente 6,0.
- 20 En una realización, la formulación mencionada anteriormente comprende hasta aproximadamente el 5 % (p/v) de manitol.

En una realización, la formulación mencionada anteriormente comprende aproximadamente de 6 a 8 mg/ml de [trans-3-hexenoil]hGHRH (1-44) amida.

- 25 En una realización, al menos el 70 % de [trans-3-hexenoil]hGHRH (1-44) amida no se desamida en Asn⁸ después de 2 años de almacenamiento en condiciones de temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C. En realizaciones adicionales, al menos el 80 %, 85 % o el 90 % de la [trans-3-hexenoil]hGHRH (1-44) amida no se desamida en Asn⁸ después de 2 años de almacenamiento en condiciones de temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C.
- 30

En otro aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica liofilizada o deshidratada preparada por liofilización o deshidratación de la formulación farmacéutica mencionada anteriormente. En una realización, al menos el 70 % de la molécula de GRF o [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida mencionada anteriormente no se desamida en Asn⁸ después de 3 años de almacenamiento en condiciones de temperatura de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. En realizaciones adicionales, al menos el 80 %, 85 % o el 90 % de la molécula de GRF o [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida no se desamida en Asn⁸ después de 3 años de almacenamiento en condiciones de temperatura de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C.

- 35
- 40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para inducir la secreción de la hormona del crecimiento en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de (a) la formulación farmacéutica mencionada anteriormente o (b) una formulación farmacéutica líquida preparada por suspensión de la formulación farmacéutica liofilizada o deshidratada mencionada anteriormente con una solución acuosa estéril.

- 45 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de (a) la formulación farmacéutica mencionada anteriormente, o (b) una formulación farmacéutica líquida preparada por suspensión de la formulación farmacéutica liofilizada o deshidratada mencionada anteriormente con una solución acuosa estéril, para inducir la secreción de la hormona del crecimiento en un sujeto.
- 50

En otro aspecto, la presente invención proporciona la formulación farmacéutica mencionada anteriormente, o una formulación farmacéutica líquida preparada por suspensión de la formulación farmacéutica liofilizada o deshidratada mencionada anteriormente con una solución acuosa estéril, para su uso en la inducción de la secreción de la hormona del crecimiento en un sujeto.

- 55 En una realización, la formulación farmacéutica es para su uso en el tratamiento de al menos una lipodistrofia asociada con VIH, lipohipertrofia por VIH, obesidad abdominal, deficiencia de GH, fragilidad, deterioro cognitivo leve, deficiencia inmunitaria, desgaste asociado con una enfermedad crónica o enfermedad a largo plazo, o desnutrición asociada con una enfermedad crónica o una enfermedad a largo plazo.

En una realización, la formulación mencionada anteriormente se administra para, o es para su administración a, una dosis diaria de la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg.

5 En una realización, la formulación mencionada anteriormente se administra por vía subcutánea, o es para administración subcutánea.

En una realización, la solución acuosa estéril mencionada anteriormente es agua estéril. En una realización, la solución acuosa estéril mencionada anteriormente comprende un agente antimicrobiano.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende la formulación farmacéutica mencionada anteriormente, en un recipiente estéril.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende la formulación liofilizada o deshidratada mencionada anteriormente, en un recipiente estéril.

En una realización, el kit mencionado anteriormente comprende además una solución acuosa estéril. En una realización adicional, la solución acuosa estéril comprende un agente antimicrobiano, más particularmente m-cresol o alcohol bencílico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una formulación farmacéutica líquida estabilizada de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el método: (a) combinar la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y una β -ciclodextrina en una solución acuosa solución, en donde la β -ciclodextrina no está conjugada con la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (b) ajustar el pH de la solución a 5,5 a 6,5. En una realización, el método comprende adicionalmente liofilizar o deshidratar la solución después de la etapa (b).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para estabilizar [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma de acuerdo con la reivindicación 11. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para estabilizar [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéutica de la misma de acuerdo con la reivindicación 12. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir la desamidación de Asn⁸ de [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma de acuerdo con la reivindicación 11. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir la desamidación de Asn⁸ de [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma de acuerdo con la reivindicación 12. La formulación farmacéutica líquida de la presente invención es adecuada para la liofilización o deshidratación y proporciona una alta estabilidad de la molécula de GRF cuando la formulación se almacena en forma liofilizada, seca o sólida durante un largo periodo de tiempo, tal como al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses o al menos 36 meses. La formulación farmacéutica líquida de la presente invención es adecuada para la liofilización o deshidratación y proporciona una alta estabilidad de la molécula de GRF cuando la formulación se almacena en una forma liofilizada/seca para diferentes condiciones de temperatura, tal como de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C (temperatura ambiente), a aproximadamente 40 °C o inferior a aproximadamente 40 °C. En una realización, la molécula de GRF cuando la formulación se almacena en una forma liofilizada, seca o sólida es estable durante al menos 24 meses o al menos 36 meses a temperatura ambiente, es decir, a aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención se harán más evidentes tras la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de realizaciones específicas de la misma, dadas a modo de ejemplo solamente con referencia a los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 En los dibujos adjuntos:

La **Figura 1** muestra el efecto de liberación de GH de la tesamorelina (TH9507) y sus principales degradantes (como se define a continuación); la **Figura 2** el AUC_(0-60 min) de GH provocado por impurezas de TH9507 (como se define a continuación;

TH1063: véase la Tabla 1) en ratas hembras;

la **Figura 3** muestra la $C_{\text{máx}}$ de GH producida por impurezas de TH9507 (como se define a continuación) en ratas hembras;

la **Figura 4** muestra las respuestas a la dosis de impurezas de TH9507 (como se define a continuación) en un ensayo basado en células;

la **Figura 5** muestra el efecto de la concentración de tesamorelina en el nivel de los degradantes después de la incubación en una solución de manitol al 4 % y sacarosa al 2 %, pH 5,5 a 25 °C durante 10 días (TH0511: Asp⁸ tesamorelina; TH0601: β-Asp⁸ tesamorelina; Met (Ox): Met²⁷-tesamorelina oxidada; Asu³: tesamorelina con intermedio de succinimidilo en la transformación de Asp³ en el derivado de β-Asp³);

la **Figura 6** muestra el contenido de los principales degradantes después de 4 días de incubación a 45 °C (A) y 8 días a 37 °C (B) en formulaciones líquidas que contienen 6 mg/ml y 8 mg/ml de tesamorelina (TH0601, TH0511 y RRT0.90: como se ha definido anteriormente; TH0677: β-Asp³ tesamorelina; TH0286: Met²⁷-tesamorelina oxidada; RRT 0,78 y RRT 0,85 son impurezas desconocidas);

la **Figura 7** muestra el contenido de los principales productos de degradación en función del pH en la formulación líquida de tesamorelina (6-8 mg/ml) después de la incubación a 25 °C durante 12 días (TH0601, TH0677, TH0511, RRT 0,78, RRT 0,85 y RRT0.90: como se ha definido anteriormente);

la **Figura 8** muestra el efecto de hidroxipropil betadex sobre la degradación de tesamorelina en una solución a pH 6,0;

la **Figura 9A** muestra los espectros UV de tesamorelina (8 mg/ml) en presencia de HP-β-CD. Los cambios inducidos por HP-β-CD se refieren principalmente a la absorbancia por residuos aromáticos (250-290 nm). Los espectros se registran a una resolución de 2 nm en una cubeta de cuarzo de 1 mm;

la **Figura 9B** muestra los espectros de segunda derivada de tesamorelina (8 mg/ml) en presencia de diferentes concentraciones de HP-β-CD (del 0 % al 25 % (p/v), con aumentos del 2,5 %);

la **Figura 10** muestra espectros diferenciales de segunda derivada de tesamorelina (8 mg/ml) en presencia de diferentes concentraciones de HP-β-CD (del 0 % al 25 % (p/v), con un aumento del 2,5 %);

la **Figura 11** muestra la intensidad de señal a 260, 276 y 284 nm en los espectros diferenciales de segunda derivada de tesamorelina en función de la concentración de HP-β-CD almacenada a 4 °C durante un periodo de 15 meses (datos de RP-HPLC);

la **Figura 12** muestra la región de huellas del espectro ¹H,¹H-NOESY de tesamorelina no marcada. Los d_{N(i,i+1)} secuenciales para los residuos 1 a 13 están marcados;

la **Figura 13** muestra los espectros de HNCACB de residuos marcados isotópicamente de tesamorelina (a) en ausencia y (b) en presencia de HP-β-CD (superposición de color gris);

la **Figura 14** muestra el plano F1, F3 del espectro NOESY editado con ¹³C (región aromática) de tesamorelina (a) en ausencia y (b) en presencia de HP-β-CD (superposición de color gris);

la **Figura 15** muestra espectros de dicroísmo circular (promedio de 3 exploraciones) de tesamorelina en presencia de HP-β-CD en solución. La concentración de tesamorelina es de 1 mg/ml. Los espectros se registraron a 20 °C;

la **Figura 16** muestra el efecto de la concentración de HP-β-CD sobre la formación de degradantes de tesamorelina desamidados. Las formulaciones que contenían 8 mg/ml de tesamorelina y diferentes concentraciones de HP-β-CD se incubaron a 15 °C durante 14 días;

la **Figura 17** muestra la extrapolación de la tasa de formación de TH0601 en estudios de estabilidad acelerada a las condiciones de 5 °C (mostradas por la flecha). La tasa de formación de TH0601 en la formulación de control (manitol al 5 %) se muestra para comparación;

la **Figura 18** muestra la extrapolación de la velocidad de la formación de TH05111 en estudios de estabilidad acelerada a las condiciones de 5 °C (mostradas por la flecha). Se muestra la tasa de la formación de TH05111 en la formulación de control (manitol al 5 %) para comparación;

la **Figura 19** muestra la formación de producto β-Asp⁸ isomerizado TH0601 tras la incubación de tesamorelina (panel izquierdo) y TH05111 (panel derecho) en las soluciones que contienen manitol al 5 % o HP-β-CD al 10 % a pH 6. Las concentraciones de péptido son 8 mg/ml tanto para tesamorelina como para TH05111;

la **Figura 20** muestra los cromatogramas de HPLC de tesamorelina y sus degradantes en formulaciones de M-β-CD y libres de M-β-CD a pH 4,5 antes de (A) y después de (B) la incubación a 25 °C durante 1 mes; y

la **Figura 21** muestra los cromatogramas de HPLC de tesamorelina y sus degradantes en formulaciones de M-β-CD y libres de M-β-CD a pH 6,0 antes de (A) y después de (B) la incubación a 25 °C durante 1 mes.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden [trans-3-hexenoi]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Varias formulaciones de [trans-3-hexenoi]hGRF (1-44)

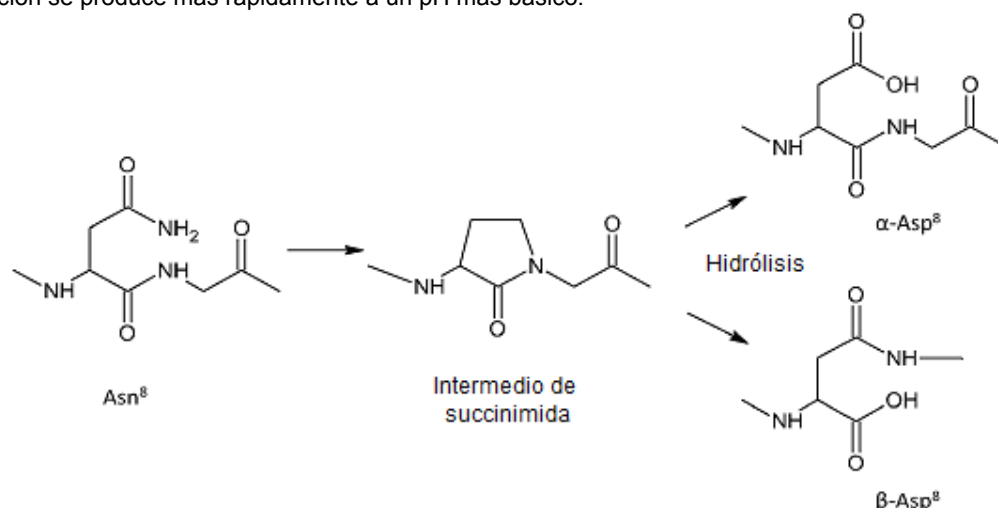
amida (también denominada en el presente como tesamorelina o TH9507) se han ilustrado y comparado en el presente documento.

[trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida, también denominada en el presente documento como tesamorelina o TH9507, tiene la siguiente estructura:

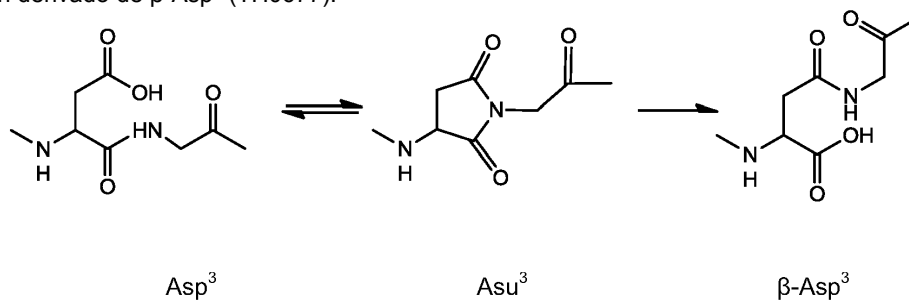
(trans)CH₃-CH₂-CH=CH-CH₂-CO-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂ (SEQ ID NO: 7).

Degradación de tesamorelina

Los "puntos calientes" de degradación química de tesamorelina son los residuos Asp³, Asn⁸ y Met²⁷. Se ha demostrado para las moléculas de GRF que la desamidación del residuo Asn⁸ se produce a pH ácido <2 o pH ligeramente básico (Bongers J. Heimer EP, Lambros T, Pan YCE, Campbell RM, Felix AM. Degradation of aspartic acid and asparagine residues in human growth hormone-releasing factor. Int. J. Peptide Protein Res., 39, 1992, 364-374). Hay dos mecanismos principales para la desamidación de Asn⁸, dependiendo de las condiciones del pH. La desamidación a pH ácidos (pH <2) se produce por hidrólisis directa de la amida de cadena lateral y no va acompañada de isomerización del residuo Asp⁸ resultante. Se sabe que la desamidación de Asn⁸ a pH > 5 va acompañada de isomerización en un intermedio de succinimida seguido de hidrólisis, y da como resultado la formación de derivados de β-Asp⁸ (TH0601) y Asp⁸ (o α-Asp⁸; TH05111). Como para muchos otros péptidos, la desamidación se produce más rápidamente a un pH más básico.



Al mismo tiempo, se sabe que el pH ligeramente ácido favorece la formación de la impureza TH1063 que se ha identificado como intermedio de succinimidilo (imida cíclica en la posición 3) en la transformación de Asp³ en tesamorelina en derivado de β-Asp³ (TH0677):



En los estudios descritos en el presente documento, se prepararon diversas formulaciones que comprendían

tesamorelina y se analizaron en cuanto a su estabilidad, especialmente con respecto a la presencia de uno o más productos de degradación. Los productos de degradación evaluados incluyen uno o más de los siguientes:

- 5
 - TH0286: tesamorelina oxidada en Met²⁷;
 - TH0511: Asp⁸ tesamorelina (es decir, tras la desamidación de Asn⁸);
 - TH0601: β-Asp⁸ tesamorelina;
 - TH0677: β-Asp³ tesamorelina;
 - TH1063: Véase la Tabla 1; tesamorelina con forma cíclica de Asp³, es decir, Asu³ tesamorelina

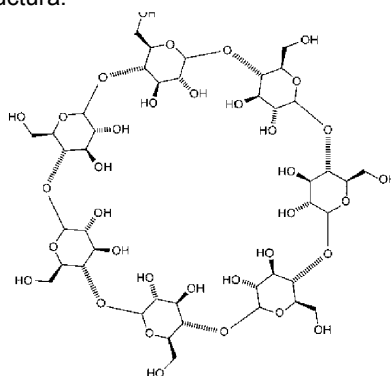
10 En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica (por ejemplo, líquida o sólida) que comprende:

- una [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de dicha molécula, y
- una β-ciclodextrina modificada,

15

en la que la formulación tiene un pH de 5,5 a 6,5 (tras la resolubilización/reconstitución en el caso de una formulación sólida) y en la que la β-ciclodextrina no está conjugada con dicha molécula de GRF o sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

20 La β-ciclodextrina es una molécula anular de azúcar de 7 miembros, que contiene siete unidades de α-D-glucopiranosido. Tiene la siguiente estructura:



Uno o más de los grupos hidroxilo de una o más de las unidades de azúcar se pueden modificar, por ejemplo, con un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo, o con un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo sustituido. "β-ciclodextrina modificada" como se usa en el presente documento se refiere a una β-ciclodextrina que contiene una modificación en uno o más grupos hidroxilo de una o más unidades de azúcar de la β-ciclodextrina, es decir, un grupo o resto que está unido a uno o más grupos hidroxilo de una o más unidades de azúcar de la β-ciclodextrina. Como tal, en realizaciones, la β-ciclodextrina modificada es un alquil-, alquenil-, alquinil, alquil sustituido-, alquenil sustituido o alquinil sustituido-β-ciclodextrina sustituida (por ejemplo, con una sustitución de hidroxilo). En realizaciones, los grupos alquilo, alquenilo o alquinilo son grupos alquilo (C₁-C₆), alquenilo (C₁-C₆) o alquinilo (C₁-C₆). En una realización adicional, la β-ciclodextrina modificada es un alquil (C₁-C₆) β-ciclodextrina, en una realización adicional metil-β-ciclodextrina (M-β-CD). En una realización adicional, la β-ciclodextrina modificada es una hidroxialquil (C₁-C₆) β-ciclodextrina, en una realización adicional hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD).

35

En las formulaciones de la presente invención, la β-ciclodextrina actúa como un estabilizante, lo que significa que estabiliza la molécula de GRF o sal farmacéuticamente aceptable de la misma contra procesos que reducirían su actividad, en una realización contra procesos químicos, en una realización adicional contra la desamidación de Asn⁸ a pH farmacéuticamente aceptables.

40

La presente invención proporciona además un método para estabilizar [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que comprende las etapas de:

- 45
 - (a) combinar la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma con una β-ciclodextrina modificada en una solución acuosa, en donde la β-ciclodextrina no está conjugada con la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y
 - (b) ajustar el pH de la solución a 5,5 a 6,5.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para inhibir la desamidación de Asn⁸ y la isomerización de [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que comprende las etapas de:

- 5 (a) combinar la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma con una β -ciclodextrina modificada en una solución acuosa, en donde la β -ciclodextrina no está conjugada con la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y
- (b) ajustar el pH de la solución a 5,5 a 6,5.

10 La presente invención proporciona además el uso de β -ciclodextrina para estabilizar una molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que la β -ciclodextrina no está conjugada con la molécula de GRF o sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En una realización, la β -ciclodextrina y la molécula de GRF o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma están en una solución acuosa a pH 5,5 a 6,5.

15 La presente invención proporciona además el uso de una β -ciclodextrina modificada para inhibir la desamidación de Asn⁸ e isomerización de de [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que la β -ciclodextrina no está conjugada con la molécula de GRF o sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En una realización, la β -ciclodextrina y la molécula de GRF o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma están en una solución acuosa a pH 5,5 a 6,5.

Mientras que las formulaciones de la invención comprenden [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y una β -ciclodextrina modificada, la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma no está conjugada con la β -ciclodextrina, es decir, no hay unión covalente entre la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y la β -ciclodextrina.

En una realización, la β -ciclodextrina está presente en la formulación a una concentración del 5 al 10 % (p/v), en una realización adicional de aproximadamente del 7,5 al 10 % (p/v), en realizaciones adicionales aproximadamente el 5, 7,5, 10, (p/v), en una realización adicional de aproximadamente el 10 % (p/v).

30 Como se usa en el presente documento, "biológicamente aceptable" (o "farmacéuticamente aceptable") se refiere a materiales caracterizados por la ausencia de efectos biológicos tóxicos o adversos (o limitados) *in vivo*. Se refiere a aquellos compuestos, formulaciones, formulaciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del criterio médico sólido, son adecuados para su uso en contacto con los fluidos biológicos y/o los tejidos y/u órganos de un sujeto (por ejemplo, ser humano, animal) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

El término "formulación" o "formulación farmacéutica" como se usa en el presente documento se refiere a preparaciones que están en tal forma que permiten que [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a los que se administrará la formulación. Se refiere a una formulación de [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida y cualquier tampón, agente de carga, adyuvante, vehículo, estabilizante, tensioactivo y otros aditivos que se consideren necesarios para mantener niveles aceptables de actividad y estabilidad del agentes activos durante la fabricación, el almacenamiento, la manipulación y el uso. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para la liofilización y el almacenamiento a largo plazo de [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida en una forma liofilizada. La molécula de GRF es (hexenoil trans-3)hGHRH(1-44)NH₂ (SEQ ID NO: 7). [trans-3-hexenoil]hGHRH (1-44) amida (también denominada en el presente documento (hexenoil trans-3)hGRF(1-44)NH₂, tesamorelina o TH9507) es un análogo del factor de liberación de hormona del crecimiento humana sintético que comprende la secuencia de 44 aminoácidos del factor de liberación de la hormona de crecimiento humana (hGRF) en la cual un resto hexenoil, una cadena lateral C₆, se ha anclado en Tyr1 en el extremo N-terminal.

[trans-3-hexenoil]hGHRH (1-44) amida tiene la siguiente estructura:

55 (trans)CH₃-CH₂-CH=CH-CH₂-CO-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂ (SEQ ID NO: 7).

El término "sólido" como se usa en el presente documento en el contexto de una formulación de la invención, se refiere a la formulación en una forma que está sustancialmente libre de humedad, por ejemplo, una forma sólida (por

ejemplo, en polvo). Tal formulación sólida se puede preparar mediante cualquier método de eliminación de la humedad, por ejemplo, mediante liofilización, deshidratación u otros métodos de secado o métodos para eliminar el agua.

- 5 El término "suspensión", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la suspensión, resuspensión, reconstitución y/o solubilización dependiendo del contexto. Para una cuestión de consistencia, el término "suspensión" se usa en el presente documento para referirse en general a la adición de un líquido adecuado a una formulación sólida.
- 10 El término "agente de carga" como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto utilizado para proporcionar una tonicidad adecuada o deseada de la formulación líquida o de la solución resultante de la suspensión de la formulación sólida o liofilizada. Preferiblemente, la tonicidad adecuada o deseada de la solución es igual o se aproxima a la isotonicidad con el fluido fisiológico del sujeto al que se administra la solución. Por ejemplo, en una realización, la formulación o solución tiene una tonicidad de aproximadamente 250 a aproximadamente 350
- 15 mOsm/l, en realizaciones adicionales de aproximadamente 275 a aproximadamente 325 mOsm/l, de aproximadamente 290 a aproximadamente 310 mOsm/l, o aproximadamente 300 mOsm/l. Por ejemplo, se pueden usar uno o más azúcares como agente de carga. Los azúcares, como se usan en el presente documento, incluyen, pero sin limitación, monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los ejemplos de azúcares adecuados incluyen, pero sin limitación, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa y dextrano. El azúcar también incluye
- 20 alcoholes de azúcar, tales como manitol, inositol, dulcitol, xilitol y arabitol. Las mezclas de azúcares también se pueden usar de acuerdo con esta invención. En una realización, el agente de carga es manitol. Además, uno o más aminoácidos, tales como glicina o metionina, se pueden usar como agente de carga. También se pueden usar diversas combinaciones de los anteriores como agente de carga. En una realización, el agente de carga está presente en la formulación a una concentración de hasta el 10 % (p/v). En una realización adicional, el agente de
- 25 carga está a una concentración de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 10 % (p/v) en la formulación. En una realización adicional, el agente de carga está en una concentración de hasta aproximadamente el 5 % (p/v) en la formulación. En una realización adicional, el agente de carga está a una concentración de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 5 % (p/v) en la formulación. En una realización, el agente de carga está en una concentración de aproximadamente el 2,5 a aproximadamente el 5 % (p/v). En una realización adicional, el agente de carga está
- 30 en una concentración de aproximadamente el 2,5, 3,5, 4,0, 4,3, 4,7 o el 5,0 % (p/v).

- En una realización, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención tienen un pH farmacéuticamente aceptable de 5,5 a 6,5. En una realización adicional, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención tienen un pH de 5,5 a 6,2. En una realización adicional, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención tienen un
- 35 pH de 5,5 a 6,0. En una realización adicional, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención tienen un pH de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,5. En una realización adicional, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención tienen un pH de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2. En una realización adicional, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención tienen un pH de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,0, en una realización adicional de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,1. En una realización adicional, las
- 40 formulaciones farmacéuticas de la presente invención tienen un pH de aproximadamente 5,5, 5,8, 6,0 o 6,2. En una realización adicional, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención tienen un pH de aproximadamente 6,0.

- En una realización, las formulaciones de la presente invención comprenden además un agente antimicrobiano.
- 45 "Agente antimicrobiano" como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más agentes capaces de eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos (tales como bacterias, hongos y protozoos). Un agente antimicrobiano puede ser selectivo (por ejemplo, para un tipo particular de microorganismo) o no selectivo (con actividad contra una amplia gama de microorganismos). Las combinaciones o agentes antimicrobianos también pueden usarse en las formulaciones de la presente invención. En realizaciones, el agente antimicrobiano es m-cresol, alcohol bencílico o
- 50 una combinación de los mismos. En una realización, el agente antimicrobiano está presente en la formulación a una concentración de hasta aproximadamente el 0,9 % (p/v), en una realización adicional de hasta aproximadamente el 0,6 % (p/v), en una realización adicional hasta aproximadamente el 0,3 % (p/v), en realizaciones adicionales a una concentración de aproximadamente el 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 o 0,30 % (p/v).

- 55 En una realización, las formulaciones de la presente invención comprenden además un tampón. La cantidad adecuada de tampón variará dependiendo del tipo de tampón utilizado y su capacidad de tamponamiento. El tampón debe ser de un tipo apropiado para y presente en la formulación en una cantidad suficiente para mantener el pH final de la formulación en el intervalo de pH mencionado anteriormente. En realizaciones, el tampón es un tampón de lactato, un tampón de acetato, un tampón de glutamato, un tampón de aspartato, un tampón de glicina o una

combinación de los mismos. En una realización, la concentración de tampón en las formulaciones farmacéuticas de la invención es de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 50 mM. En otra realización, la concentración de tampón en las formulaciones farmacéuticas de la invención es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 30 mM. En una realización adicional, la concentración de tampón en las formulaciones farmacéuticas de la invención es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM. En una realización adicional, la concentración de tampón en las formulaciones farmacéuticas de la invención es de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mM.

La cantidad de [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida contenida en las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se puede determinar dependiendo de la naturaleza y/o la gravedad de la enfermedad a tratar, las características del paciente (edad, peso, etc.) y otros factores. La formulación comprende [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida a una concentración de 1 mg/ml a 8 mg/ml, en una realización adicional de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 8 mg/ml, en una realización adicional de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 8 mg/ml, en realizaciones adicionales a una concentración de aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8 mg/ml, en una realización adicional de aproximadamente 6 mg/ml, en una realización adicional aproximadamente 8 mg/ml. En realizaciones, la formulación comprende una cantidad de [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida para efectuar la administración de una dosis de [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida que sea mayor que o igual a aproximadamente 1 mg; en una realización adicional mayor que o igual a aproximadamente 2 mg, en una realización adicional de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 4 mg, en una realización adicional de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 4 mg; en una realización adicional, aproximadamente 1, 2, 3 o 4 mg.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener además diluyentes, agentes solubilizantes, excipientes, modificadores del pH, agentes calmantes, tampones, agentes reductores que contienen azufre, antioxidantes o similares, si se desea. Por ejemplo, los agentes reductores que contienen azufre incluyen N-acetilcisteína, N-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y sales de los mismos, tiosulfato de sodio, glutatión, metionina y compuestos que contienen sulfhidrilo, tales como ácido tioalcanoico que tiene de 1 a 7 átomos de carbono. Los antioxidantes incluyen metionina, ácido eritórbito, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, α -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y sus sales, palmitato de L-ascorbilo, estearato de L-ascorbilo, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, galato de triamilo, galato de propilo o agentes quelantes tales como tetraacetato de etilendiamina disódica (EDTA), pirofosfato de sodio, metafosfato de sodio. Otros componentes comúnmente añadidos también pueden estar contenidos, por ejemplo, sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, bicarbonato de sodio; y sales orgánicas tales como citrato de sodio, citrato de potasio, acetato de sodio.

Una formulación estable es aquella en la que la [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida en la misma conserva esencialmente su estabilidad e integridad física y química tras el almacenamiento. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas o péptidos están disponibles en la técnica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Para un cribado rápido, la formulación puede mantenerse, por ejemplo, a aproximadamente 40 °C durante 2 semanas a 1 mes (y durante hasta 6 meses), momento en el que se mide la estabilidad. La formulación también se puede mantener, por ejemplo, de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C (por ejemplo, aproximadamente 4 o 5 °C) o en condiciones de temperatura ambiente (de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C, preferiblemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C) durante al menos 6 meses, momento en el cual se mide la estabilidad. La formulación de la presente invención ofrece una mejor estabilidad de la molécula de GRF en su forma líquida o sólida y también es adecuada para preservar la estabilidad de la molécula de GHRH en forma sólida o liofilizada durante un periodo de almacenamiento a temperatura elevada (por ejemplo, aproximadamente 40 °C), a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 15-30 °C, en una realización adicional de aproximadamente 15-25 °C, en una realización adicional de aproximadamente 20-25 °C, en una realización adicional de aproximadamente 25 °C), a temperatura refrigerada (por ejemplo, de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, en una realización adicional aproximadamente 4 o 5 °C). El periodo de almacenamiento puede expresarse, por ejemplo, en semanas, meses o años, y puede ser de al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 4 semanas, al menos 6 semanas, al menos 8 semanas, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, al menos 18 meses, al menos 2 años, al menos 30 meses, o al menos 3 años. Por ejemplo, una formulación "estable" puede ser una en la que más de aproximadamente el 80 %, más de aproximadamente el 90 %, más de aproximadamente el 95 %, más de aproximadamente el 96 %, más de aproximadamente el 97 %, más de aproximadamente el 98 % o más de aproximadamente el 99 % del agente activo no degradado está presente en la formulación. La estabilidad de las formulaciones de la presente invención se puede medir usando RP-HPLC (por ejemplo, véanse los Ejemplos a continuación). Una "cantidad o concentración eficaz estabilizadora" como se usa en el presente documento, pretende designar una cantidad o concentración

eficaz para obtener una formulación estable en la que más de aproximadamente el 80 %, más de aproximadamente el 90 %, más de aproximadamente el 95 %, más de aproximadamente el 96 %, más de aproximadamente el 97 %, más de aproximadamente el 98 %, o más de aproximadamente el 99 % del agente activo no degradado está presente en la formulación.

5

En una realización, la estabilidad se puede caracterizar en términos de desamidación, o falta de la misma, de Asn⁸ de la molécula de GRF. Como tal, en realizaciones, la formulación líquida o composición de la invención comprende una molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que en realizaciones al menos aproximadamente el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 % o el 90 % de la molécula de GRF no se desamida en Asn⁸ después de 2 años de almacenamiento en condiciones de temperatura refrigerada (es decir, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 °C, en una realización adicional de aproximadamente 4 o 5 °C). En realizaciones adicionales, la formulación o composición liofilizada o deshidratada de la invención comprende una molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que en realizaciones, al menos aproximadamente el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o el 95 % de la molécula de GRF no se desamida en Asn⁸ después de 3 años de almacenamiento a temperatura ambiente (aproximadamente de 15 °C a aproximadamente 30 °C, en una realización adicional de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C, en una realización adicional de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, en una realización adicional aproximadamente 25 °C).

10

15

20

25

En realizaciones adicionales, la formulación o composición liofilizada o deshidratada de la invención comprende una molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que en realizaciones, al menos aproximadamente el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o el 95 % de la molécula de GRF no se desamida en Asn⁸ después de 3 años de almacenamiento a temperatura ambiente (aproximadamente de 15 °C a aproximadamente 30 °C, seguido de reconstitución y 2 semanas de almacenamiento de 15 °C a aproximadamente 25 °C, en una realización adicional de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, en una realización adicional aproximadamente 25 °C).

30

35

40

En realizaciones adicionales, la formulación o composición líquida de la invención comprende una molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que en realizaciones, no más de aproximadamente el 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 % o 4 % de la molécula de GRF se desamida en Asn⁸ después de 2 años de almacenamiento en condiciones de temperatura refrigerada (es decir, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 °C, en una realización adicional de aproximadamente 4 o 5 °C). En realizaciones adicionales, la formulación o composición liofilizada o deshidratada de la invención comprende una molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que en realizaciones, no más de aproximadamente el 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o el 5 % de la molécula de GRF se desamida en Asn⁸ después de 3 años de almacenamiento a temperatura ambiente (aproximadamente de 15 °C a aproximadamente 30 °C, en una realización adicional de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C, en una realización adicional de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, en una realización adicional aproximadamente 25 °C).

Las formulaciones o composiciones de la invención pueden ser útiles para inducir o estimular la secreción de GH en un sujeto.

45

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para inducir o aumentar la secreción de la hormona de crecimiento en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de la formulación o composición mencionadas anteriormente.

50

En otro aspecto, la presente invención proporciona un uso de la formulación o composición mencionada anteriormente, para inducir o aumentar la secreción de la hormona del crecimiento en un sujeto.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un uso de la formulación o composición mencionada anteriormente, para la preparación de un medicamento para inducir o aumentar la secreción de la hormona del crecimiento en un sujeto.

55

En otro aspecto, la presente invención proporciona la formulación o composición mencionada anteriormente, para la preparación de un medicamento para inducir o aumentar la secreción de la hormona del crecimiento en un sujeto.

En otro aspecto, la presente invención proporciona la formulación o composición mencionada anteriormente, para su uso en la inducción o aumento de la secreción de la hormona del crecimiento en un sujeto.

- Los términos "estimular", "aumentar" o "inducir" o cualquier variación de estos términos tal como se usa en el presente documento, se refieren a un aumento medible de una actividad biológica. En realizaciones, el aumento es al menos un aumento del 10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 % (2 veces), 200 % (3 veces) en la actividad biológica con respecto a un control. Por ejemplo, se encuentra que un análogo de GRF estimula la actividad de GHRHr cuando se mide un aumento en los niveles de GH después de la administración del análogo de GRF a un sujeto (por ejemplo, animal, ser humano) en comparación con un sujeto no administrado con el análogo de GRF.
- 10 En vista de su actividad agonista de GHRHr y sus propiedades de liberación de GH, las formulaciones o composiciones de la invención pueden ser útiles como un medicamento, para aplicaciones profilácticas y/o terapéuticas en las que es deseable la estimulación de la secreción de GH/IGF-1, por ejemplo para el tratamiento o la prevención de afecciones/trastornos/enfermedades asociadas con la función de GRF y/o GH (por ejemplo, en las que la función reducida de GH y/o GHRH está implicada en la etiología de la enfermedad/trastorno). Las enfermedades y afecciones en las que la administración de análogos/derivados de GH, GRF o GRF puede ser beneficiosa se han descrito ampliamente en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2009/009727, WO 2006/042408, WO 2005/037307, WO 2004/105789). Dichas afecciones/trastornos/enfermedades incluyen, por ejemplo, síndromes asociados con la acumulación de grasa, hipercolesterolemia, obesidad, síndrome X, lipohipertrofia, lipoatrofia, lipodistrofia (por ejemplo, síndrome de lipodistrofia asociada al VIH), función cognitiva alterada, vigilancia diurna deteriorada, función disminuida del sistema inmunitario (por ejemplo, inmunodeficiencias tales como deficiencias de linfocitos T), catabolismo de proteínas musculares, enfermedades/afecciones asociadas con desgaste muscular tales como sarcopenia, fragilidad, efectos secundarios relacionados con la radioterapia y/o quimioterapia (por ejemplo, en pacientes infectados por VIH y pacientes con cáncer), caquexia (por ejemplo, en pacientes con cáncer), enanismo hipotálamo hipofisario, quemaduras, osteoporosis, insuficiencia renal, fractura ósea no unida, enfermedad o infección aguda/crónica debilitante, cicatrización de heridas, problemas postoperatorios, insuficiencia de lactancia, infertilidad en mujeres, afecciones neurodegenerativas, tumores dependientes del receptor GRF, afecciones relacionadas con el envejecimiento, trastornos/alteraciones del sueño.
- Por lo tanto, en otros aspectos, la presente invención proporciona un método para (1) estimular la vigilancia diurna y/o la función cognitiva, por ejemplo, en afecciones relacionadas con el envejecimiento, deterioro cognitivo leve (MCI), síntomas previos al Alzheimer (Alzheimer preaparición), demencia y/o alteración del sueño (por ejemplo, alteración del sueño relacionada con la edad), (2) mejorar/prevenir/tratar afecciones metabólicas asociado con acumulación de grasa y/o hipercolesterolemia (obesidad, obesidad/adiposidad abdominal, obesidad abdominal con trastornos metabólicos, obesidad abdominal con deficiencia relativa de GH, síndrome metabólico o síndrome X, lipohipertrofia, lipoatrofia, lipodistrofia (por ejemplo, síndrome de lipodistrofia asociada al VIH), dislipidemia, hipertrigliceridemia), (3) mejorar el anabolismo en condiciones catabólicas/debilitantes, tales como las observadas en insuficiencia renal aguda o crónica (por ejemplo, desgaste por insuficiencia renal aguda o crónica), insuficiencia cardíaca crónica (por ejemplo, desgaste por insuficiencia cardíaca crónica), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (por ejemplo, desgaste por fibrosis quística en adultos), fragilidad, quemaduras, infecciones (sepsis), distrofia muscular, insuficiencia cardíaca congestiva, afecciones neurodegenerativas (Alzheimer, síndromes previos a Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), SIDA, malnutrición proteica después de terapia con corticosteroides a largo plazo, después de una fractura ósea sin unión, fractura de cadera, trauma o cirugía mayor (problemas posquirúrgicos), osteoporosis, inmovilización a largo plazo, caquexia relacionada con el cáncer, sarcopenia (por ejemplo, sarcopenia relacionada con la edad), malabsorción gastrointestinal (síndrome del intestino corto (SBS), enfermedad de Crohn) particularmente en sujetos ancianos, por ejemplo para aumentar la masa y/o función muscular, (4) mejorar la función inmune o la reconstitución de estados inmunodeficientes (por ejemplo, inmunodeficiencias de linfocitos T) tales como el asociado con el envejecimiento, infección por VIH/SIDA o después de dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia (en pacientes infectados con VIH y pacientes con cáncer), (5) alterar un parámetro lipídico ((a) disminuir el colesterol; (b) disminución del colesterol no HDL; (c) disminución de triglicéridos; y/o (d) disminuir la proporción de colesterol total/colesterol HDL); (6) alterar un parámetro de composición corporal ((a) aumentar la masa corporal magra, (b) disminuir la grasa del tronco, (c) disminuir la grasa visceral, (d) reducir la circunferencia abdominal, (e) disminuir el tejido adiposo visceral (VAT); y/o (f) disminuir la relación VAT/tejido adiposo subcutáneo (SAT), (7) mejorar la fertilidad o tratar la infertilidad (en mujeres), tratar la insuficiencia de lactancia, (8) tratar la deficiencia de GH (por ejemplo, deficiencia de GH con obesidad abdominal), proporcionar terapia de reemplazo de GH, por ejemplo, en adultos, tratar la estatura corta idiopática (ISS) (9) tratar tumores relacionados con receptores GRF, (10) tratar enanismo hipotálamico pituitario, (11) mejorar la cicatrización de heridas, (12) tratar quemaduras, (13) tratar una enfermedad o infección debilitante aguda/crónica, y/o (14) prevenir/tratar una afección caracterizada por la formación ósea deficiente o disminuida (por ejemplo, osteoporosis); comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de la formulación o composición mencionada

anteriormente, a un sujeto que lo necesite.

En otros aspectos, la presente invención proporciona un uso de la formulación o composición mencionada anteriormente que comprende la molécula de GRF mencionada anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para mejorar, prevenir y/o tratar las afecciones, enfermedades o trastornos indicados anteriormente, o para la preparación/fabricación de un medicamento para mejorar, prevenir y/o tratar las afecciones, enfermedades o trastornos indicados anteriormente. En otros aspectos, la presente invención proporciona la formulación o composición mencionada anteriormente que comprende la molécula de GRF mencionada anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la mejora, prevención y/o tratamiento de las afecciones, enfermedades o trastornos indicados anteriormente, o para la preparación/fabricación de un medicamento para mejorar, prevenir y/o tratar las afecciones, enfermedades o trastornos indicados anteriormente.

El término "tratamiento" o "tratar" como se usa en el presente documento, se define como la aplicación o administración de la formulación o composición mencionada anteriormente a un sujeto, que tiene un trastorno, una enfermedad, un síntoma de trastorno o enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, reducir la progresión o afectar al trastorno/enfermedad y/o los síntomas del trastorno/enfermedad. En una realización, el tratamiento da como resultado un efecto nulo o sustancialmente nulo en el control de la glucosa en sangre (por ejemplo, sin efectos clínicamente significativos).

El término "prevención" o "prevenir" como se usa en el presente documento, se define como la aplicación o administración de la formulación o composición mencionada anteriormente a un sujeto, que tiene una predisposición hacia un trastorno/enfermedad o que está en riesgo de desarrollar el trastorno/enfermedad, con el propósito de prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad/trastorno o de los síntomas, o reducir la gravedad de la enfermedad/trastorno o de los síntomas, cuando se administra antes del inicio/aparición de la enfermedad/trastorno o de los síntomas.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr la actividad biológica deseada (por ejemplo, inducir la secreción de GH) y/o el resultado profiláctico/terapéutico (por ejemplo, prevención y/o tratamiento de las enfermedades/trastornos mencionados anteriormente). Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz en el contexto de la terapia; una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz en el contexto de la profilaxis. Una cantidad eficaz de un compuesto de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta profiláctica/terapéutica óptima. Una cantidad eficaz también es aquella en la que cualquier efecto beneficioso profiláctico/terapéutico contrarresta cualquier efecto tóxico o perjudicial del compuesto. Para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos pueden ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. En una realización, el análogo de GRF se administra a una dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 30 mg, en una realización adicional de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 o 25 mg, en una realización adicional de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 20 mg, en una realización adicional a una dosis diaria de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg.

La formulación o composición de la presente invención se puede administrar, o puede ser para administración, por cualquier ruta convencional, tal como intravenosa, oral, transdérmica, intraperitoneal, subcutánea, mucosal, intramuscular, intranasal, intrapulmonar, parenteral o tópica. En una realización, la formulación o composición se administra o es para administración por vía subcutánea.

En una realización, la prevención y/o el tratamiento mencionados anteriormente comprenden la administración de la formulación o composición mencionada anteriormente, junto con uno o más agentes activos/terapéuticos adicionales. La combinación de agentes y/o composiciones profilácticas/terapéuticas se puede administrar o coadministrar (por ejemplo, consecutivamente, simultáneamente, en diferentes momentos) en cualquier forma de dosificación convencional. La coadministración en el contexto de la presente invención se refiere a la administración de más de un agente terapéutico en el transcurso de un tratamiento coordinado para lograr un resultado clínico mejorado. Dicha coadministración también puede ser coextensiva, es decir, producirse durante periodos de tiempo superpuestos. Por ejemplo, un primer agente se puede administrar a un paciente antes, concomitantemente, antes y después, o después de que se administre un segundo agente activo. Los agentes pueden, en una realización, combinarse/formularse en una única composición y así administrarse al mismo tiempo. En una realización, el uno o

más agentes activos de la presente invención se usan/administran en combinación con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión.

Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" o "paciente" se refieren a animales de sangre caliente tales como mamíferos, por ejemplo, gatos, perros, ratones, cobayas, caballos, vacas, ovejas y seres humanos. En una realización, el sujeto es un mamífero. En una realización adicional, el sujeto mencionado anteriormente es un ser humano.

La invención proporciona además un método para preparar las formulaciones o composiciones descritas en el presente documento. El método comprende formular o combinar juntos (por ejemplo, disolver, mezclar) los ingredientes en condiciones para obtener la formulación deseada (por ejemplo, con respecto a la formulación, concentración, pH, etc.). Por ejemplo, con respecto al pH, el pH de la formulación se puede determinar y ajustar en consecuencia (si es necesario) para que esté dentro del intervalo deseado.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una formulación farmacéutica estabilizada de [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que comprende las etapas de:

- (a) combinar la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y una β -ciclodextrina modificada en una solución acuosa, en donde la β -ciclodextrina modificada no está conjugada con la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y
- (b) ajustar el pH de la solución a 5,5 a 6,5.

En una realización, la solución puede deshidratarse o liofilizarse posteriormente para obtener una formulación sólida, que puede reconstituirse posteriormente.

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras "comprender" (y cualquier forma de comprender, tales como "comprenden" y "comprende"), "tener" (y cualquier forma de tener, tales como "tienen" y "tiene"), "incluir" (y cualquier forma de incluir, tales como "incluyen" e "incluye") o "contener" (y cualquier forma de contener, tales como "contienen" y "contiene"), son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos adicionales no enumerados ni etapas de proceso. El término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye una variación inherente de error para el dispositivo o el método que se emplea para determinar el valor, y puede incluir, por ejemplo, una variación del 10 %. Cuando se cita explícitamente un valor, debe entenderse que los valores que son aproximadamente la misma cantidad que el valor indicado están también dentro del alcance de la presente descripción, ya que son intervalos basados en los mismos. El uso de las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

La presente invención se ilustra con más detalles mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

40 MODO(S) PARA REALIZAR LA INVENCION

La presente invención se ilustra con más detalles mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Síntesis de [trans-3-hexenoil]hGHRH (1-44) amida y sustancias relacionadas. [trans-3-hexenoil]hGHRH (1-44) amida, también denominada en el presente documento tesamorelina o TH9507, así como sustancias relacionadas TH0286, TH0601, TH0677, y TH05111, se sintetizan usando la síntesis de péptidos en fase sólida FMOC comenzando con resina amida tricíclica de Ramage. Los aminoácidos protegidos y el ácido trans-3-hexenoilo se usan para el acoplamiento, por lo que cada aminoácido protegido y ácido trans-3-hexenoilo se disuelve en DMF tratada con óxido de aluminio con TBTU como agente de acoplamiento y DIPEA para promover la activación antes del acoplamiento. La completitud de los acoplamientos se controla mediante la prueba de ninhidrina de Kaiser (E. Kaiser et al. Anal. Biochem. "Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid Phase Synthesis of Peptides") y la prueba de TNBS (Means and Feeney, 1971, Holden-Day Inc. San Francisco "Chemical Modification of Proteins" pág. 217).

Los grupos protectores de la cadena lateral y el enlace péptido-resina se escinden agitando la resina peptídica protegida en un cóctel de escisión que consiste en TFA al 90 %, EDT al 5 % y agua al 5 %. El péptido en bruto se purifica mediante HPLC a través de un esquema de purificación en tres etapas usando los siguientes tampones,

MSA al 0,1 %, TEAP a pH 6,5, acetato de amonio y HOAc al 2 % proporcionando péptidos puros. Los lotes de péptidos purificados se agrupan y se reconstituyen en ácido acético al 0,5 % y se liofilizan. El derivado de Asu³, es decir, TH1063, se aísla por cromatografía de intercambio catiónico a partir de la solución de TH9507 incubada a pH 4 durante 3 semanas a 40 °C.

5

Proceso de liofilización. Las muestras se liofilizan por congelación a -50 °C y mantenimiento, secado primario a -10 °C por debajo de 100 mTorr y secado secundario a 25 °C por debajo de 100 mTorr.

Ejemplo 2: Caracterización de la actividad de las impurezas de tesamorelina

10

Las impurezas de TH9507 (tesamorelina), TH0286, TH05111, TH0601, TH0677 y TH1063, se caracterizaron en términos de su potencia y eficacia en un ensayo de gen indicador, así como su respuesta a GH en ratas Sprague Dawley hembra. El ensayo del gen indicador se realizó en células de riñón de hámster bebé (BHK) que expresan de forma estable el receptor GRF humano y un gen indicador de fosfatasa alcalina inducible por cAMP; los péptidos se analizaron a concentraciones de 1 pM a 10 µM. La respuesta aguda a GH se midió en muestras de sangre obtenidas de ratas hembras a las que se inyectaron 10 µg/péptidos de rata en manitol al 5 %.

15

Las CE₅₀ de TH0286, TH05111 y TH1063 fueron comparables con TH9507. Los péptidos B-Asp (TH0601 y TH0677) eran menos potentes con CE₅₀ que eran 500 y 71 veces mayores que TH9507, respectivamente. TH0677 y TH1063 no produjeron GH en ratas; TH0286, TH05111 y TH0601 estimularon GH con AUC_(0-60 min) de 1,3, 2,9 y 12,4 veces menor que TH9507 y C_{máx} de 1,2, 2,2 y 14,0 veces menor que TH9507.

20

En conclusión, los péptidos β-Asp (TH0601 y TH0677) eran menos potentes *in vitro* y menos activos *in vivo*. TH1063 era completamente inactivo *in vivo*.

25

Los estudios de estabilidad de TH9507 mostraron la formación de algunas impurezas debido a la ciclación de aspartato y a la oxidación de metionina. La bioactividad *in vitro* e *in vivo* de estos productos de oxidación de TH9507 se caracterizaron en células y en animales.

30

Estudios de rata. Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley (hembras, 250-300 g) de Charles River Inc. Los animales se mantuvieron en grupos de 4 ratas por jaula y se mantuvieron con comida estándar de laboratorio en un ciclo 12:12 de luz:oscuridad.

35

El día del experimento, los animales se anestesiaron con isoflurano al 2,5 %. Se realizó una abertura en la sección media del cuello para exponer la arteria carótida. La arteria carótida se canuló con un tubo de polipropileno (PE-50) para la extracción de sangre. A las ratas se les inyectaron por vía subcutánea los péptidos (10 µg/rata) disueltos en la formulación 5 (acetato de sodio 20 mM, D-manitol al 5 % pH 5 (ajustado con AcOH)). Se recogieron muestras de sangre (400 µl) en la dosis previa y 5, 10, 15, 30 y 60 minutos después de la inyección en tubos microtainer que contenían K₃EDTA y 25 µl de solución de sal tamponada de Hank (AHBSS). Las muestras se centrifugaron inmediatamente en una microcentrífuga durante 2 minutos y el plasma se recogió en tubos Eppendorf™ con tapón de rosca y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras se mantuvieron a -80 °C.

40

ELISA de GH. Las muestras de plasma de rata se descongelaron en hielo, se agitaron vorticialmente brevemente para mezclar el contenido y se centrifugaron a 9.000 RPM durante 2 min a 4 °C. Los niveles de GH se determinaron usando el kit ELISA de hormona de crecimiento de rata/ratón de Millipore® (Cat. n.º EZRMGH-45K). Las muestras se diluyeron 10 veces con el tampón de ensayo y se añadieron 10 µl de las muestras diluidas junto con 90 µl de tampón de ensayo a la placa de ELISA. El resto del ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante.

45

Ensayo del gen indicador. Las células BHK transfectadas de forma estable con el receptor GRF humano y un gen indicador de fosfatasa alcalina se pusieron en placas de 96 pocillos a 5 x 10⁴ células/pocillo y se incubaron durante una noche. El día siguiente, las células se lavaron dos veces con PBS y se mantuvieron durante 10-30 min en tampón de ensayo (DMEM sin rojo de fenol, HEPES 20 mM y suero bovino fetal inactivado por calor al 1 % (FBS)). Los péptidos de 10⁻⁵ M a 10⁻¹² M se añadieron a las células y se incubaron durante 24 h. El nivel de fosfatasa alcalina en los sobrenadantes de cultivo se realizó usando el kit de detección de fosfatasa alcalina de Invitrogen® (cat. n.º T1017).

55

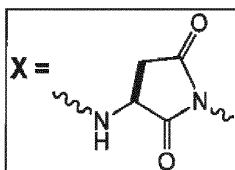
Análisis estadístico. La curva estándar se trazó usando la ecuación logística de 4 parámetros utilizando el software GraphPad Prism™ y se usó para determinar la concentración de GH de las muestras de plasma. Los datos se analizaron usando un análisis de varianza unidireccional. Se usó la prueba de Bonferroni para hacer comparaciones

entre diferentes tratamientos.

Respuesta de GH en ratas. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y las Figuras 1-3. Las impurezas de TH9507 TH0677 y TH1063 no estimularon la secreción de GH en ratas. Sin embargo, TH0286, TH05111 y TH0601 provocó la secreción de GH con AUC de 1,3, 2,9 y 12,4 veces y $C_{\text{máx}}$ de 1,2, 2,2 y 14,0 veces inferior a TH9507 respectivamente. AUC y $C_{\text{máx}}$ entre TH9507 y TH0286 no fueron significativamente diferentes.

Tabla 1: Resumen de AUC(0-60min) y $C_{\text{máx}}$ de respuesta de GH a impurezas de TH9507

Código del producto	Nombre del producto	Secuencia química	Formulación	AUC (ng*min/ml)	$C_{\text{MÁX}}$ (ng/ml)	$T_{\text{MÁX}}$ (min)	n (ratas)
TH9507 (SEQ ID NO:7)	Tesamorelina	Hexenoil-Y-A-D-A-I-F-T-N-S-Y-R-K-V-L-G-Q-L-S-A-R-K-L-L-Q-D-I-M-S-R-Q-Q-G-E-S-N-Q-E-R-G-A-R-A-R-L-NH ₂	manitol al 5 %	18953 ± 6317	645 ± 194	10	4
TH0286 (SEQ ID NO:8)	N-Hex-hGRF[1-44]Met[O] ₂₇ amida	<i>Trans</i> -3-hexenoil-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met[O]-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH ₂	manitol al 5 %	14751 ± 5745	542 ± 173	10	4
TH05111 (SEQ ID NO:9)	TH9507 Asp8	Hexenoil-Y-A-D-A-I-F-T-D-S-Y-R-K-V-L-G-Q-L-S-A-R-K-L-L-Q-D-I-M-S-R-Q-Q-G-E-S-N-Q-E-R-G-A-R-A-R-L-NH ₂	manitol al 5 %	6540 ± 2647	294 ± 126	5	4
TH0601 (SEQ ID NO:10)	TH9507 beta-Asp8	Hexenoil-Y-A-D-A-I-F-T-beta D-S-Y-R-K-V-L-G-Q-L-S-A-R-K-L-L-Q-D-I-M-S-R-Q-Q-G-E-S-N-Q-E-R-G-A-R-A-R-L-NH ₂	manitol al 5 %	1533 ± 734	46 ± 30	5	4
TH0677 (SEQ ID NO:11)	TH9507 beta-Asp3	<i>trans</i> -3-Hexenoil-Y-A-beta D-A-I-F-T-N-S-Y-R-K-V-L-G-Q-L-S-A-R-K-L-L-Q-D-I-M-S-R-Q-Q-G-E-S-N-Q-E-R-G-A-R-A-R-L-NH ₂	manitol al 5 %	NR	NR	NR	4
TH1063 (SEQ ID NO:12)	Forma cíclica de TH9507 en Asp ³	<i>trans</i> -3-Hexenoil-Y-A-X-A-I-F-T-N-S-Y-R-K-V-L-G-Q-L-S-A-R-K-L-L-Q-D-I-M-S-R-Q-Q-G-E-S-N-Q-E-R-G-A-R-A-R-L-NH ₂ (para X véase a continuación)	manitol al 5 %	NR	NR	NR	4
NR: sin respuesta							



Los productos de degradación/isomerización en Asp³ y Asp⁸ en configuración β , es decir, TH0601 y TH0677, se muestran como especies biológicamente inactivas. Por lo tanto, su nivel en formulaciones farmacéuticas de tesamorelina debe mantenerse en un nivel lo más mínimo posible.

La secuencia de aminoácidos de tesamorelina corresponde a la del péptido de liberación de hormona de crecimiento (GRF) de origen natural. GRF pertenece a la familia glucagón/secretina de hormonas peptídicas que comparten similitudes de estructura primaria. Entre todas las hormonas peptídicas en la familia glucagón/secretina, solo GRF tiene un residuo Asn en la posición 8; otras biomoléculas contienen residuos Asp o Ser. Cabe destacar que se ha informado que el análogo de tesamorelina que porta Asp⁸ en una configuración α , es decir, TH05111, es equipotente *in vitro* y conserva ~30 % de la actividad de liberación de GH *in vivo* en comparación con la molécula parental (Figura 1).

Potencia y eficacia *in vitro*. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 4. Todas las impurezas produjeron la expresión del gen indicador pero no con las mismas potencias. Las CE₅₀ de TH0286, TH05111 y TH1063 son comparables con TH9507. Sin embargo, los péptidos β -Asp (TH0601 y TH0677) eran menos potentes con CE₅₀ 500 veces y 71 veces mayor que TH9507, respectivamente.

20

Tabla 2: Parámetros de respuesta a la dosis de impurezas de TH9507

Péptidos	Nombre del producto	Secuencia	CE ₅₀ (nM)	EMAX (%)	SNR	n (experimentos)
TH9507 (SEQ ID NO:7)	Tesamorelina	Hexenoil-Y-A-D-A-I-F-T-N-S-Y-R-K-V-L-G-Q-L-S-A-R-K-L-L-Q-D-I-M-S-R-Q-Q-G-E-S-N-Q-E-R-G-A-R-A-R-L-NH ₂	0,06 ± 0,02	100,0 ± 11,3	22,3	3
TH0286 (SEQ ID NO:8)	N-Hex-hGRF[1-44]Met[O]27 amida	<i>Trans</i> -3-hexenoil-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met[O]-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH ₂	0,16 ± 0,03	103,5 ± 21,6	23,1	3
TH05111 (SEQ ID NO:9)	TH9507 Asp 8	Hexenoil-Y-A-D-A-I-F-T-D-S-Y-R-K-V-L-G-Q-L-S-A-R-K-L-L-Q-D-I-M-S-R-Q-Q-G-E-S-N-Q-E-R-G-A-R-A-R-L-NH ₂	0,08 ± 0,02	113,6 ± 17,0	25,3	3
TH0601 (SEQ ID NO:10)	TH9507 beta-Asp 8	Hexenoil-Y-A-D-A-I-F-T-beta D-S-Y-R-K-V-L-G-Q-L-S-A-R-K-L-L-Q-D-I-M-S-R-Q-Q-G-E-S-N-Q-E-R-G-A-R-A-R-L-NH ₂	30,0 ± 30,4	120,5 ± 23,5	26,9	3
TH0677 (SEQ ID NO:11)	TH9507 beta-Asp3	<i>trans</i> -3-Hexenoil-Y-A-beta D-A-I-F-T-N-S-Y-R-K-V-L-G-Q-L-S-A-R-K-L-L-Q-D-I-M-S-R-Q-Q-G-E-S-N-Q-E-R-G-A-R-A-R-L-NH ₂	4,24 ± 1,45	116,2 ± 25,8	25,9	3
TH1063 (SEQ ID NO:12)	Forma cíclica de TH9507 en Asp ³	<i>trans</i> -3-Hexenoil-Y-A-X-A-I-F-T-N-S-Y-R-K-V-L-G-Q-L-S-A-R-K-L-L-Q-D-I-M-S-R-Q-Q-G-E-S-N-Q-E-R-G-A-R-A-R-L-NH ₂ (para X véase la Tabla 1)	0,20 ± 0,07	95,7 ± 8,1	21,3	2

SNR: relación señal-ruido

En resumen, todas las impurezas de TH9507 fueron activas *in vitro*. Las potencias de TH0286, TH05111 y TH1063 fueron comparables a TH9507. TH0601 y TH0677 fueron menos potentes. TH0286, TH05111 y TH0601 estimularon la secreción de GH con diferentes potencias, todas las cuales fueron menores que las de TH9507; las diferencias entre TH9507 y TH0286 no fueron significativas.

Ejemplo 3: Formulaciones

Se prepararon diversas formulaciones que comprendían tesamorelina (véase la Tabla 3 a continuación) y se sometieron a estrés en condiciones de estabilidad acelerada, por ejemplo, 25 °C, 37 °C y 45 °C, y luego se analizó y se comparó la degradación de la tesamorelina en condiciones de estrés con la del control. La formulación que contenía de 4 a 8 mg/ml de tesamorelina en presencia de manitol al 4 % y sacarosa al 2 % o manitol al 5 % se usó como control.

15 **Tabla 3: Formulaciones preparadas y ensayadas en condiciones aceleradas**

Formulación N.º	Concentración de TH9507	pH	Modificador del pH	Excipiente	Agente antimicrobiano
LF1	6 mg/ml	5,5	N/A	Manitol al 5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF2	6 mg/ml	3,0	Ácido láctico	Manitol al 5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF3	6 mg/ml	3,0	Ácido acético	Manitol al 5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF4	6 mg/ml	3,0	Ácido láctico	MgCl ₂ 50 mM; sacarosa al 7 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF5	1 mg/ml	5,5	N/A	Sacarosa al 9 %	N/A
LF6	6 mg/ml	4,0	Ácido láctico 0,03 M	Manitol al 5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF7	6 mg/ml	4,0	Ácido glutámico 0,03 M	Manitol al 5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF8	6 mg/ml	4,0	Ácido aspártico 0,03 M	Manitol al 5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF9	6 mg/ml	4,8	Glicina 0,03 M	Manitol al 5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF10	6 mg/ml	4,0	Cloruro sódico/HCl	Manitol al 5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF11	6 mg/ml	3,0	Ácido láctico	Acetato de Zn	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF12	6 mg/ml	4,0	Ácido láctico	Acetato de Zn	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF13	6 mg/ml	3,0	Ácido láctico	Acetato de Mg	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF14	6 mg/ml	4,0	Ácido láctico	Acetato de Mg	Alcohol bencílico al 0,9 %

LF15	6 mg/ml	5,0	N/A	Manitol al 5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF16	6 mg/ml	6,0	N/A	Manitol al 5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF17	6 mg/ml	3,0	N-Acetilcisteína	Manitol al 5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF18	8 mg/ml	5,0	N/A	Glicina al 2,5 %	Alcohol bencílico al 0,9 %
LF19	8 mg/ml	5,0	N/A	Glicina al 2,5 %	m-cresol al 0,3 %
LF20	8 mg/ml	5,0	N/A	Glicina al 2,5 %; metionina al 0,05 %	m-cresol al 0,3 %
LF21	8 mg/ml	4,5	lactato Na 0,025 M	HP-β-Ciclodextrina al 10 %	m-cresol al 0,3 %
LF22	8 mg/ml	4,5	lactato Na 0,025 M	HP-β-Ciclodextrina al 5 %; Manitol al 2,5 %	m-cresol al 0,3 %
LF23	8 mg/ml	4,5	lactato Na 0,025 M	HP-β-Ciclodextrina al 2 %; Manitol al 4 %	m-cresol al 0,3 %
LF24	8 mg/ml	4,5	lactato Na 0,025 M	Manitol al 5 %	m-cresol al 0,3 %
LF25	8 mg/ml	5,0	N/A	Manitol al 5 %	m-cresol al 0,3 %
LF26	8 mg/ml	5,5	N/A	Manitol al 5 %	m-cresol al 0,3 %
LF27	6 mg/ml	5,5	N/A	Manitol al 5 %	m-cresol al 0,3 %
LF28	8 mg/ml	6,0	Lactato Na 0,01	Manitol al 5 %	m-cresol al 0,3 %
LF29	8 mg/ml	6,0	Lactato Na 0,01	HP-β-Ciclodextrina al 2 %; Manitol al 4 %	m-cresol al 0,3 %
LF30	8 mg/ml	6,0	Lactato Na 0,01	HP-β-Ciclodextrina al 5 %; Manitol al 2,5 %	m-cresol al 0,3 %
LF31	8 mg/ml	6,0	Lactato Na 0,01	HP-β-Ciclodextrina al 10 %;	m-cresol al 0,3 %

Las concentraciones de los excipientes de carga, es decir, manitol, sacarosa, etc., estaban próximas o correspondían a la concentración isotónica. En diversas formulaciones, se eligió alcohol bencílico o m-cresol como conservante antimicrobiano. Durante el análisis por HPLC se observó que, además de los degradantes típicos, es decir, β-Asp⁸⁻ (TH0601), Asp⁸⁻ (TH05111), β-Asp³⁻ (TH0677), Asu³⁻(TH1063), y Met²⁷ (Ox)-tesamorelina (TH0286), se formaron impurezas desconocidas que tenían RRT de 0,78 y 0,83-0,85 en las formulaciones.

Ejemplo 4: Efecto de la concentración y pH de tesamorelina

10 El nivel de diversos productos de degradación se evaluó en formulaciones que contenían manitol al 4 % y sacarosa al 2 % y diferentes concentraciones de tesamorelina a pH 5,5. Como se ve en la Figura 5, se observó una mayor susceptibilidad de Asn⁸ a la desamidación en soluciones de tesamorelina más concentradas (4-8 mg/ml). Se encontró que los residuos de Asp³ eran menos susceptibles a la degradación en las soluciones de tesamorelina de 4-8 mg/ml en comparación con las soluciones menos concentradas, y no se encontró ningún efecto de la

15 concentración de tesamorelina en la tasa de oxidación de Met²⁷.

En estudios adicionales, el contenido de impurezas en formulaciones que contienen 6 mg/ml y 8 mg/ml de tesamorelina a pH 5,5 (ambas contienen m-cresol al 0,3 %) después de la incubación a 45 °C y 37 °C se comparó como se muestra en la Figura 6. Como se puede ver a partir de estos datos, solo se encontró que el contenido de TH0601 se veía significativamente afectado por la concentración de tesamorelina. En general, el potencial de estabilidad de formulaciones de 6 mg/ml y 8 mg/ml a pH 5,5 puede considerarse comparable y, como tal, se estudió el efecto del pH utilizando formulaciones de tesamorelina de 6 y 8 mg/ml.

Para examinar adicionalmente el efecto del pH sobre la degradación, el contenido de impurezas en las formulaciones ensayadas (Tabla 1) se representó gráficamente en función del pH. Como puede verse en la Figura 7, las condiciones débilmente ácidas (pH <5) favorecen la formación de succinimida (impureza RRT 0,90 (TH1063)) y la impureza RRT 0,85, mientras que los pH ácidos y cercanos a neutros (pH ≤3 y pH >5) estimulan la desamidación en Asn⁸, generando un mayor contenido de derivados de β-Asp⁸-(TH0601) y α-Asp⁸-(TH05111).

También se puede observar que la adición de glicina como agente de tonicidad promueve la formación de la impureza RRT 0,78 a pH 5 (Figura 7). Cuando se usa manitol o HP-β-CD como agente de tonicidad (5 %), la aparición de RRT 0,78 es bastante independiente del pH. La formación del derivado α-Asp⁸ (TH05111), así como las impurezas RRT 0,85 y RRT 0,90 a pH 4 aparentemente está catalizada por iones Mg²⁺ y Zn²⁺ (Figura 7). Al mismo tiempo, Mg²⁺ muestra un efecto inhibitor sobre la formación de TH05111 a pH 3.

Ha de apreciarse que el contenido de las impurezas RRT 0,90 disminuye linealmente al aumentar el pH. Al mismo tiempo, tanto los productos de desamidación (TH0601) como de isomerización (TH0677) muestran un aumento exponencial a medida que el pH aumenta de pH 4 a pH 6 (Figura 5).

Ejemplo 5: Efecto de la adición de hidroxipropil-betadex

Se encontró sorprendentemente que la adición de hidroxipropil-beta-ciclodextrina, HP-β-CD o hidroxipropil betadex, al 2-10 % (p/v), mejora la estabilidad química de la tesamorelina, y particularmente la resistencia a la desamidación, en comparación con otras formulaciones (Figura 8).

Se cree que las ciclodextrinas son útiles para solubilizar péptidos poco solubles en formulaciones líquidas. Sin embargo, el efecto estabilizador de la ciclodextrina contra la desamidación y la isomerización del residuo Asn⁸ no puede explicarse por interacciones directas de Asn⁸ con hidroxipropil betadex como se demostró por RMN (véase a continuación).

El efecto de la concentración de HP-β-CD sobre la tasa de degradación de tesamorelina se estudió adicionalmente variando el contenido de HP-β-CD en presencia de diferentes cantidades de manitol con el fin de mantener las soluciones isotónicas. Dado que la solución que contiene manitol al 5 % o HP-β-CD al 25 % es isotónica, las combinaciones de manitol y HP-β-CD se prepararon en las siguientes proporciones:

- 0 % de HP-β-CD con el 5 % de manitol;
- 2,5 % de HP-β-CD con el 4,7 % de manitol;
- 5 % de HP-β-CD con el 4,3 % de manitol;
- 10 % de HP-β-CD con el 3,5 % de manitol;
- 25 % de HP-β-CD con el 0 % de manitol;

Todas las soluciones se prepararon en lactato sódico 0,01 M y el pH se ajustó a pH 6.

Métodos analíticos. La pureza, el contenido del compuesto parental y las impurezas individuales, se ensayaron mediante HPLC en una columna de fase inversa usando el gradiente de acetonitrilo en una solución acuosa de trifluoroacetato al 0,1 % para resolver el compuesto precursor y las sustancias relacionadas. Las soluciones de formulación se diluyeron para contener 1 mg/ml de acetato de tesamorelina.

Para las mediciones de RMN, las muestras se enriquecieron con D₂O al 10 %. Los espectros de ¹H RMN se adquirieron en un Varian INOVA a 600 MHz. Se usaron secuencias de pulso con presaturación de agua (Biopack, Varian) para la espectroscopía correlacionada 1D y 2D (COSY), espectroscopía de efecto Overhauser nuclear (NOESY) y Hartmann-Hahn homonuclear (HOHAHA o TOCSY). Los FID han sido transformados por Fourier con el software VNMR (Varian) utilizando procedimientos estándar de apodización. Los espectros se trazaron en archivos en formato PDF usando CCPNMR y se convirtieron en PNG posteriormente.

Los espectros de dicroísmo circular (CD) se registraron utilizando un espectropolarímetro Jasco-810. Los espectros de CD se registraron de 300 nm a 190 nm a 20 °C y a 37 °C. Las muestras de formulaciones de tesamorelina se prepararon con la concentración de péptido de 1 mg/ml. La tesamorelina se disolvió en las soluciones que contenían el 0 %, 1 %, 2,5 %, 5 %, 10 % y 15 % de HP- β -CD.

5 *Resultados.* El efecto estabilizador de HP- β -CD con respecto a la desamidación en Asn⁸ fue inesperado en vista de la naturaleza puramente física de las interacciones entre dos compuestos. La existencia de interacciones físicas entre la porción N-terminal de la molécula de tesamorelina y HP- β -CD se confirmó mediante espectroscopía UV y RMN.

10 *Espectroscopia UV.* Con el fin de verificar si los residuos hidrófobos interactúan con HP- β -CD, los espectros UV de tesamorelina se registraron y se analizaron en presencia de diferentes concentraciones de HP- β -CD. Los espectros UV típicos de tesamorelina en presencia de diferentes cantidades de HP- β -CD se muestran en la Figura 9A. El espectro de tesamorelina en agua presenta una banda ancha con un máximo a 276 nm como resultado del
15 solapamiento de las bandas de adsorción de Phe y Tyr (Svane A.S.P. et al., 2008, Biophys J., 95: 366-377; Balestrieri C. et al., 1978, Eur. J. Biochem. 90: 433-440). La adición de HP- β -CD induce un cambio a longitudes de onda más largas y una disminución en la intensidad de la banda de 276 nm (Figura 9A).

Los espectros UV de segunda derivada de tesamorelina en presencia de diferentes concentraciones de HP- β -CD se
20 analizaron a continuación para detectar cambios en la absorción por residuos de Phe frente a Tyr. La banda ancha en la región 250-280 muestra una serie de componentes centrados en 257, 261, 267, 270 y 278 nm en los espectros de segunda derivada (Figura 9B). Como se sabe que la Phe absorbe UV a una longitud de onda más corta, las señales a 261 (máximos positivos) se atribuyen a este residuo aromático. El componente a 278 nm (máximos negativos) se asigna a la banda de absorción de Tyr. La ubicación y la intensidad relativa de los componentes en los
25 espectros de segunda derivada corresponden bien a los indicados para los residuos Phe y Tyr (Svane A.S.P. et al., anteriormente; Balestrieri C. et al., anteriormente).

Se observa un desplazamiento notable para los máximos del componente Tyr en los espectros de segunda derivada, es decir, la señal se centra a 278 nm en HP- β -CD al 0 % y se desplaza a 279 nm en una solución al 25 %
30 de HP- β -CD (Figura 10). Esto indica que HP- β -CD interactúa con el resto aromático de al menos los residuos Tyr en tesamorelina.

Para visualizar mejor los cambios en la forma y las intensidades de los componentes de Phe y Tyr en los espectros de segunda derivada, se analizaron los espectros diferenciales de segunda derivada de tesamorelina en presencia
35 de HP- β -CD. Los espectros diferenciales de la segunda derivada se obtuvieron restando el espectro registrado en el agua de los registrados en la solución de HP- β -CD (Figura 11).

Los cambios en la ubicación y la intensidad de la señal de Tyr en presencia de HP- β -CD conducen a la aparición de señal positiva a 276 nm y una señal negativa a 284 nm (Figura 11). La intensidad de ambas señales de 276 nm y
40 284 nm cambia al aumentar la concentración de HP- β -CD, mientras que la intensidad de la banda a 261 nm debido a la absorción de Phe no se ve afectada por HP- β -CD (Figura 11).

Estos hallazgos sugieren que los espectros UV de los residuos Tyr muestran un cambio a la longitud de onda más larga, mientras que los espectros UV de Phe no presentan cambios en la posición y la intensidad de la banda de
45 absorción.

Los resultados del análisis de espectros UV mostraron que HP- β -CD interactúa predominantemente con el extremo N-terminal de la porción peptídica de tesamorelina, más específicamente con el residuo Tyr1 y no con una región cercana al residuo Phe6.

50 *RMN.* La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se usó para caracterizar la región N-terminal de tesamorelina en una solución acuosa y su interacción con HP- β -CD. Los espectros de RMN obtenidos en ausencia de HP- β -CD permitieron la atribución específica de los residuos Tyr1 a Val13 de tesamorelina. Brevemente, la asignación específica de los residuos marcados isotópicamente se realizó mediante la identificación de los sistemas de espín
55 específicos en los experimentos multidimensionales. Después que se completó la asignación específica de los residuos marcados isotópicamente, los espectros de ¹H-¹H NOESY y de NOESY editados con ¹⁵N se utilizaron para identificar los sistemas de espines de residuos adyacentes para permitir su asignación completa utilizando los espectros de ¹H-¹H TOCSY y COSY. Como se muestra en la región de huellas del espectro de NOESY que se muestra en la Figura 12, la asignación específica y secuencial se llevó a cabo con éxito para los residuos Tyr1 a

Val13.

La comparación de los espectros de RMN multidimensionales en ausencia y en presencia de HP-β-CD permitió la identificación de las interacciones con tesamorelina (Figuras 13 y 14). De hecho, como se puede ver en los espectros, los desplazamientos químicos de los residuos marcados generalmente no se ven afectados por la presencia de HP-β-CD, con la notable excepción de los picos cruzados de Tyr1, que muestran claras variaciones de desplazamiento químico en todos los experimentos registrados en presencia de HP-β-CD (Figura 13). Además, la presencia de picos cruzados adicionales en la región aromática del espectro NOESY editado con ¹³C (Figura 14) revela una interacción directa entre HP-β-CD y los residuos Tyr1 y Phe6 de tesamorelina, más precisamente los átomos Hδ* y Hε* de estos residuos. Se ha de tener en cuenta que la mayor intensidad de NOE para Tyr1 sugiere una interacción preferencial de HP-β-CD con ese residuo. No se detectaron interacciones directas entre Asn⁸ y HP-β-CD.

Efecto del hidroxipropil-betadex en la conformación de tesamorelina. Para verificar si la adición de HP-β-CD a una solución de tesamorelina induce cambios conformacionales significativos, se registraron y se analizaron los espectros de CD de tesamorelina en presencia de HP-β-CD (Figura 15). Los espectros UV CD dentro del intervalo de 170 - 250 nm están dominados por la contribución de los enlaces peptídicos debido al predominio de enlaces peptídicos en relación con otros cromóforos en la estructura del péptido. Por lo tanto, un espectro UV-CD lejano refleja el conjunto de los ángulos diedros específicos de la cadena polipeptídica, y es característico para la conformación de ciertas biomoléculas promedio (Baudyš M., et al., "Peptide and Protein Characterization" en Pharmaceutical formulation Development of Peptides and Proteins, Frokjaer S., Hovgaard L. (Eds.). Taylor y Francis, 2000).

Los espectros de CD de tesamorelina en soluciones son característicos de conformación aleatoria con alguna contribución menor de estructuras de hélice α, como se deduce de la elipticidad débil a 222 nm (Figura 15). La intensidad de la señal de CD a 205 nm y 222 nm se conserva en presencia de HP-β-CD, lo que indica que la adición de este excipiente no induce cambios conformacionales mayores de tesamorelina.

Efecto de la concentración de hidroxipropil Betadex. Después de la identificación de HP-β-CD como un componente de formulación que mejora la estabilidad de tesamorelina en solución contra la desamidación a un pH farmacéuticamente aceptable, se investigó el efecto de la concentración de HP-β-CD sobre la estabilidad química del péptido.

Los resultados del estudio de estabilidad acelerada de la formulación que contiene 8 mg/ml de tesamorelina y diferentes concentraciones de HP-β-CD se muestran en la Figura 16. Como puede verse en la Figura 16, HP-β-CD tiene un profundo efecto sobre el potencial de estabilidad de tesamorelina en solución. La degradación por desamidación (TH0601, TH05111) y la isomerización del residuo Asp (TH0677) se reprime sustancialmente en las soluciones que contienen HP-β-CD al 5 % -10 % en comparación con la formulación sin HP-β-CD. Sin embargo, el efecto estabilizador con respecto a la formación de TH0601 y TH0677 ya no está presente cuando la concentración de HP-β-CD alcanza el 25 % (Figura 16).

Sobre la base de los resultados obtenidos (Figura 16), se puede concluir que se puede obtener una buena estabilidad química de la tesamorelina en la formulación líquida que contiene HP-β-CD al 10 % y manitol como agente de isotonicidad. Se encontró que la formulación que contiene HP-β-CD al y manitol al 3 % como agente de isotonicidad, a pH 6,0 ± 0,2 es isotónica (303 mOsm/kg).

Estabilidad química. La formulación que comprendía 8 mg/ml de tesamorelina, HP-B-CD al 10 %, manitol al 3,5 % y lactato de sodio 10 mM a pH 6 se almacenó a 15 °C, 25 °C, 37 °C y 45 °C durante 12-21 días. La formulación que contenía 8 mg/ml en presencia de manitol al 5 % también se sometió a estrés en las mismas condiciones para su comparación.

Las muestras se analizaron para determinar la pureza de tesamorelina y la abundancia relativa de productos de desamidación (TH0601 y TH05111). Los resultados se analizaron en términos de cinética de reacción de degradación de orden cero, y las constantes de velocidad obtenidas a diferentes temperaturas se extrapolaron a las condiciones objetivo de 5 °C (Figuras 17-18).

Sobre la base de los resultados de estabilidad acelerada, el nivel aproximado de los productos de desamidación (TH0601 y TH05111) de tesamorelina a 5 °C se puede estimar para el almacenamiento a largo plazo de la formulación líquida, como se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4: Nivel de productos de desamidación (TH0601 y TH05111) después de 2 años de almacenamiento a 5 °C, predicho a partir del análisis de las tasas de degradación de tesamorelina a 15 °C, 25 °C, 37 °C y 45 °C.

Parámetro	Formulación de control (manitol al 5 %)	Formulación 8 mg/ml de tesamorelina, HP-β-CD al 10 %, manitol al 3 %, pH 6	Mejora
TH0601	6,81 ± 0,14	4,15 ± 0,77	39 %
TH05111	6,31 ± 0,53	4,44 ± 0,21	30 %

5 Sobre la base de los resultados de estabilidad en tiempo real, la tasa aproximada de la formación de productos de desamidación (TH0601 y TH05111) a 25 °C puede estimarse para el almacenamiento a largo plazo de la formulación liofilizada, como se presenta en la Tabla 5:

Tabla 5: El nivel de productos desamidados (TH0601 y TH05111) y la tasa aproximada de su formación en formulación liofilizada compuesta por tesamorelina 8 mg/ml, HP-β-CD al 10 %, manitol al 3 %, pH 6, después del almacenamiento a 25 °C

Compuesto	Tiempo, meses					Tasa, %/año*
	0	1	3	5	6	
TH0601	0,07	0,06	0,25	0,13	0,21	0,24
TH05111	0,62	0,69	0,90	0,69	0,80	0,25
*-calculado suponiendo un aumento lineal en el nivel de impurezas con el tiempo						

Además de una estabilidad física mejorada, los resultados indican una reducción significativa en el nivel de especies desamidadas (TH0601 y TH05111) en la formulación que contiene HP-β-CD al 10 % en comparación con la formulación de control.

Ejemplo 6: Efecto de HP-β-CD en la desamidación/isomerización del residuo Asx.

Para verificar si el efecto estabilizador de HP-β-CD contra la desamidación/isomerización en la posición 8 es específico de Asn⁸ y, por lo tanto, único para la estructura de GRF, la degradación del compuesto que lleva Asp en la posición 8, es decir TH05111, en presencia de HP-β-CD, se investigó y se comparó con el de tesamorelina. La isomerización de Asp⁸ en la estructura de TH05111 conduce a la formación del degradante de tesamorelina TH0601, lo que hace posible controlar la degradación usando las mismas condiciones cromatográficas que para la tesamorelina.

La comparación de la cinética de la formación de TH0601 en las soluciones que contienen 8 mg/ml de TH05111 o tesamorelina con y sin HP-β-CD se muestra en la Figura 19. Se encontró que la isomerización del residuo de Asp⁸ en TH05111 se ve facilitada en presencia de HP-β-CD (Figura 19). Esto está en contraste con la aparente acción estabilizadora de HP-β-CD contra la desamidación/isomerización de residuos Asn⁸ en tesamorelina. Sobre la base de estos datos experimentales, se puede concluir que la inhibición de la desamidación/isomerización del residuo en la posición 8 por HP-β-CD es selectiva cuando el residuo es Asn y, por lo tanto, algo única para la secuencia de GRF.

Ejemplo 7: Efecto de metil-β-ciclodextrina en la desamidación e isomerización del residuo Asn⁸ en tesamorelina

Además de los estudios descritos en el presente documento que demuestran el efecto estabilizador de la hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) contra la desamidación/isomerización del residuo Asn⁸ de tesamorelina, el efecto de la metil-β-ciclodextrina (M-β-CD) también se ensayó para verificar que se pudiera obtener un efecto estabilizante similar con una molécula diferente de β-ciclodextrina.

Se obtuvo metil-β-ciclodextrina (M-β-CD) producida por Wacker Life Science® de Sigma. Las formulaciones que contienen 8 mg/ml de tesamorelina en presencia de M-β-CD al 5 % (p/v) y manitol al 4,25 % (p/v) para la

isotonicidad se prepararon a pH 4,5 y pH 6,0. Las formulaciones de tesamorelina de 8 mg/ml que contenían manitol al 5 % a pH 4,5 y pH 6,0 sirvieron como controles. Todas las formulaciones contenían m-cresol al 0,3 % para la protección antimicrobiana. Las formulaciones se almacenaron a 25 °C durante 1 mes.

- 5 Después de 1 mes, las muestras se analizaron por HPLC para determinar la pureza de tesamorelina y la abundancia de productos de desamidación. Los cromatogramas se muestran en las Figuras 20 y 21. Los resultados de las integraciones de cromatogramas se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Resultados de la integración del cromatograma después de la incubación de las formulaciones ensayadas durante 1 mes a 25 °C

Formulación	β-Asp ⁸ -HexGRF (TH0601)		Asp ⁸ -HexGRF (TH05111)		Asu ³ -HexGRF (TH1063)	
	Inicial	1 mes	Inicial	1 mes	Inicial	1 mes
manitol al 5 % a pH 4,5	0,10	0,11	0,67	0,72	0,16	0,42
M-β-CD al 5 % a pH 4,5	0,08	0,11	0,75	0,67	0,15	0,48
manitol al 5 % a pH 6,0	0,08	0,32	0,78	0,82	0,17	0,19
M-β-CD al 5 % a pH 6,0	0,12	0,23	0,79	0,81	0,14	0,23

A pH 4,5, la desamidación/isomerización en ambas formulaciones transcurre muy lentamente. La tasa de ciclación de Asp³ para dar Asu³ aparentemente no se ve afectada por ninguno de los excipientes. A pH 6,0, el nivel de Asu³-HexGRF no se ve afectado por la presencia de excipientes. Sin embargo, similar al efecto de HP-β-CD, la desamidación/isomerización se suprime sustancialmente en presencia de M-β-CD, como se ve desde el nivel de β-Asp⁸-HexGRF (Tabla 6 y Figura 21B).

Secuencias descritas en el presente documento:

20

SEQ ID NO: 1

Xaa Xaa Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Xaa Leu Xaa Gln
1 5 10 15

Leu Xaa Ala Arg Lys Leu Leu Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa

20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40

en la que:

25

Xaa1 = Tyr o His;

Xaa2 = Val o Ala;

Xaa13 = Val o Ile;

Xaa15 = Ala o Gly;

30

Xaa18 = Ser o Tyr;

Xaa24 = Gln o His;

Xaa25 = Asp o Glu;

Xaa27 = Met o Ile o Nle;

Xaa28 = Ser o Asn; y

cada uno de Xaa30 a Xaa44 es independientemente cualquier aminoácido o está ausente.

35

SEQ ID NO: 2

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
35 40

en la que Leu44 está protegido con un resto amida sin sustituir.

SEQ ID NO: 3 (Secuencia de aminoácidos de GRF humano)

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
35 40

5

SEQ ID NO: 4

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg
20 25

en la que Arf29 está protegido con un resto amida sin sustituir.

10

SEQ ID NO: 5 (Secuencia de aminoácidos de núcleo activo mínimo de GRF humano)

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg
20 25

SEQ ID NO: 6 (Secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 30 a 44 de GRF humano)

Gln Gln Gly Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
1 5 10 15

15

SEQ ID NO: 7

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
20 25 30

Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
35 40

en la que:

Tyr1 está unido a un resto trans-3-hexenoilo; y Leu44 está protegido con un resto amida sin sustituir.

20

El alcance de las reivindicaciones no debe estar limitado por las realizaciones preferidas expuestas en los ejemplos, sino que debe tener la interpretación más amplia consistente con la descripción en su conjunto. En las reivindicaciones, la palabra "que comprende" se usa como un término abierto, sustancialmente equivalente a la frase "que incluye, pero sin limitación". Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales

correspondientes a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25

LISTA DE SECUENCIAS

30 <110> Theratechnologies Inc.
SHINGEL, Kirill
FLEURY, Daniel

35 <120> FORMULACIONES DE MOLÉCULAS DEL FACTOR DE LIBERACIÓN DE HORMONAS DEL
CRECIMIENTO (GRF) CON
ESTABILIDAD MEJORADA

<130> S59289 QT EP SG-T

40 <140> EP 14756414.0
<141> 26-02-2014

<150> US 61/771.244
<151> 01-03-2013

<150> US 13/803.712
 <151> 14-03-2013
 5 <160> 12
 <170> PatentIn versión 3.5
 10 <210> 1
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Péptido GRF
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = Tyr o His
 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Val o Ala
 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa = Val o Ile
 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa = Ala o Gly
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa = Ser o Tyr
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa = Gln o His
 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa = Asp o Glu
 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa = Met o Ile o Nle
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (28)..(28)

	<223> Xaa = Ser o Asn
5	<220> <221> VARIANTE <222> (30)..(30) <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente
10	<220> <221> VARIANTE <222> (31)..(31) <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente
15	<220> <221> VARIANTE <222> (32)..(32) <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente
20	<220> <221> VARIANTE <222> (33)..(33) <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente
25	<220> <221> VARIANTE <222> (34)..(34) <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente
30	<220> <221> VARIANTE <222> (35)..(35) <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente
35	<220> <221> VARIANTE <222> (36)..(36) <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente
40	<220> <221> VARIANTE <222> (37)..(37) <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente
45	<220> <221> VARIANTE <222> (38)..(38) <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente
50	<220> <221> VARIANTE <222> (39)..(39) <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente
55	<220> <221> VARIANTE <222> (40)..(40) <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente
	<220> <221> VARIANTE

<222> (41)..(41)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente

5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (42)..(42)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente

10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente

15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido o está ausente

<400> 1
 Xaa Xaa Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Xaa Leu Xaa Gln
 1 5 10 15
 Leu Xaa Ala Arg Lys Leu Leu Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40

20
 <210> 2
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (44)..(44)
 <223> El residuo Leu está protegido con un resto amida sin sustituir

30
 <400> 2
 Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
 20 25 30
 Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
 35 40

35
 <210> 3
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de GRF humano
 <400> 3

Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
 20 25 30
 Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
 35 40
 <210> 4
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29).. (29)
 <223> El residuo Arg está protegido con un resto amida sin sustituir
 <400> 4
 Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg
 20 25
 <210> 5
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de núcleo activo mínimo de GRF humano
 <400> 5
 Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg
 20 25
 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos correspondiente a posiciones 30 a 44 de GRF humano
 <400> 6
 Gln Gln Gly Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
 1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido GRF modificado

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> El residuo Tyr está unido a un resto trans-3-hexenoílo
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (44)..(44)
 <223> El residuo Leu está protegido con un resto amida sin sustituir
 10
 <400> 7
 Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
 20 25 30
 Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
 35 40
 <210> 8
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Producto de degradación de tesamorelina
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> El residuo Tyr está unido a un resto trans-3-hexenoílo
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> El residuo Met está oxidado
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (44)..(44)
 <223> El residuo Leu está protegido con un resto amida sin sustituir
 35
 <400> 8
 Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
 20 25 30
 Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
 35 40
 <210> 9
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Producto de degradación de tesamorelina
 45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 5 <223> El residuo Tyr está unido a un resto trans-3-hexenoílo

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (44)..(44)
 10 <223> El residuo Leu está protegido con un resto amida sin sustituir

 <400> 9
 Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
 1 5 10 15

 Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
 20 25 30

 Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
 35 40

 15 <210> 10
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Producto de degradación de tesamorelina

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (1)..(1)
 <223> El residuo Tyr está unido a un resto trans-3-hexenoílo

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es un residuo beta-aspartato

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (44)..(44)
 <223> El residuo Leu está protegido con un resto amida sin sustituir

 <400> 10
 Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Xaa Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
 40 1 5 10 15

 Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
 20 25 30

 Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
 35 40

 <210> 11
 <211> 44
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Producto de degradación de tesamorelina

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> El residuo Tyr está unido a un resto trans-3-hexenoílo

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es un residuo beta-aspartato

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (44)..(44)
 <223> El residuo Leu está protegido con un resto amida sin sustituir

<400> 11
 Tyr Ala Xaa Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
 20 25 30
 Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
 35 40

20 <210> 12
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Producto de degradación de tesamorelina

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> El residuo Tyr está unido a un resto trans-3-hexenoílo

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es un residuo aminosuccinilo (Asu)

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (44)..(44)
 <223> El residuo Leu está protegido con un resto amida sin sustituir

45 <400> 12
 Tyr Ala Xaa Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
 20 25 30
 Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
 35 40

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica líquida que comprende:
 - 5 - [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida (SEQ ID NO: - [trans-3-hexenoil] hGRF (1-44) amida (SEQ ID NO: 7) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde la molécula de GRF comprende un resto hidrófobo unido al extremo N de la misma en una cantidad de 1 mg/ml a 8 mg/ml, y
- una β -ciclodextrina modificada a una concentración del 5 % al 10 % (p/v),
- 10 en la que dicha formulación es isotónica y tiene un pH de 5,5 a 6,5 y en la que dicha β -ciclodextrina modificada no está conjugada con dicha [trans-3-hexenoil]hGRF (1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
2. La formulación de la reivindicación 1, en la que la formulación tiene una tonicidad de 250 a 350 mOsm/l.
- 15 3. La formulación de la reivindicación 1 o 2, en la que la β -ciclodextrina modificada es hidroxipropil-p-ciclodextrina (HP- β -CD) o metil- β -ciclodextrina (M- β -CD).
4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene un pH de 5,8 a 6,2,
20 preferiblemente de 5,8 a 6,0.
5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un agente antimicrobiano, preferiblemente m-cresol, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, fenol o una combinación de los mismos.
- 25 6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma está presente en una cantidad de 4 a 8 mg/ml, preferiblemente de 6 a 8 mg/ml, más preferiblemente 8 mg/ml.
- 30 7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:
 - de 4 a 8 mg/ml de la [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,
 - del 5 al 10 % (p/v) de la β -ciclodextrina modificada, en donde la β -ciclodextrina modificada es hidroxipropil-p-ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina, o una combinación de las mismas;
 - 35 - opcionalmente hasta el 5 % (p/v) de manitol
- teniendo dicha formulación un pH de 5,5 a 6,0, preferiblemente un pH de 6,0.
- 40 8. La formulación de la reivindicación 7, en la que al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 90 %, de la [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida no está desamidada en Asn⁸ después de 2 años de almacenamiento en condiciones de temperatura de 2 °C a 8 °C.
9. Una formulación farmacéutica liofilizada o deshidratada preparada liofilizando o deshidratando la
45 formulación farmacéutica líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. La formulación liofilizada o deshidratada de la reivindicación 9, en la que al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 90 %, de la [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida no está desamidada en Asn⁸ después de 3 años de almacenamiento en condiciones de temperatura de 15 °C a 25
50 °C.
11. Un método para estabilizar o inhibir la desamidación Asn⁸ de [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en una formulación farmacéutica líquida, comprendiendo el método combinar la [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en
55 una cantidad de 1 mg/ml a 8 mg/ml con una β -ciclodextrina modificada a una concentración del 5 % al 10 % (p/v), en el que la β -ciclodextrina modificada no está conjugada con la [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y en el que la formulación es isotónica y tiene un pH de 5,5 a 6,5.
12. El método de la reivindicación 11, que comprende:

(a) combinar la [trans-3-hexenoil]hGRF(1-44) amida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma con la β -ciclodextrina modificada en una solución acuosa, en el que la β -ciclodextrina modificada no está conjugada con la molécula de GRF o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y
5 (b) ajustar el pH de la solución de 5,5 a 6,5; y opcionalmente
(c) liofilizar o deshidratar la solución de la etapa (b).

13. El método de la reivindicación 12, en el que la β -ciclodextrina modificada es hidroxipropil- β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina, o una combinación de las mismas.

10 14. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una formulación farmacéutica líquida preparada por suspensión de la formulación farmacéutica liofilizada o deshidratada de la reivindicación 9 o 10 con una solución acuosa estéril, para su uso en la inducción de secreción de hormona de crecimiento en un sujeto .

15 15. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la formulación es para su uso en el tratamiento de al menos una lipodistrofia asociada con VIH, lipohipertrofia por VIH, obesidad abdominal, deficiencia de GH, fragilidad, deterioro cognitivo leve, deficiencia inmunitaria, desgaste asociado con una enfermedad crónica o enfermedad a largo plazo, o desnutrición asociada con una enfermedad crónica o una
20 enfermedad a largo plazo.

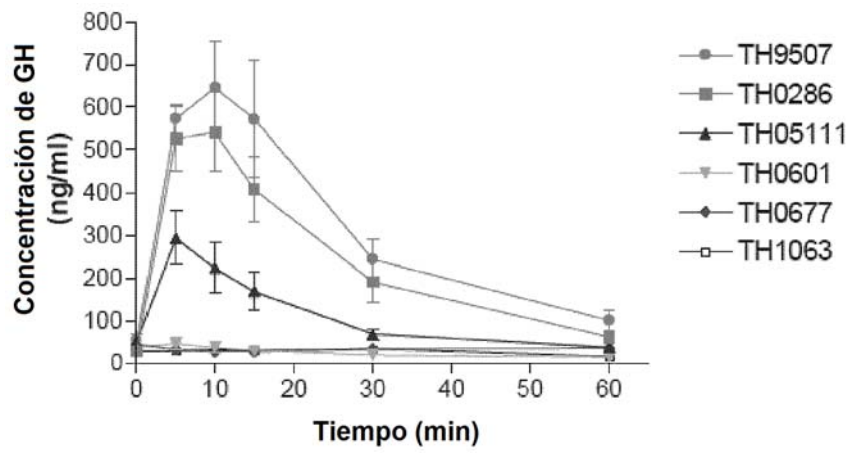


FIGURA 1

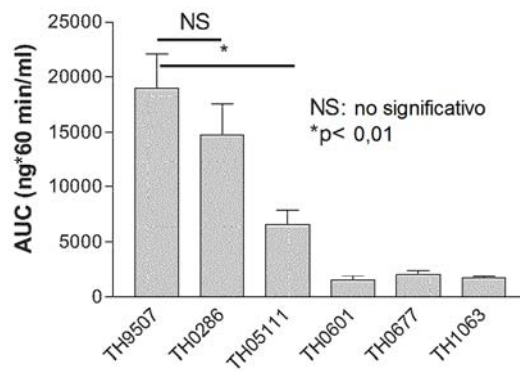


FIGURA 2

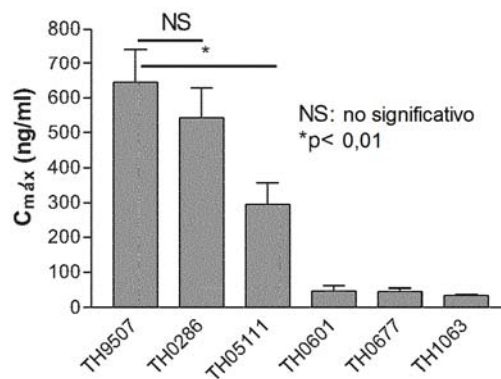


FIGURA 3

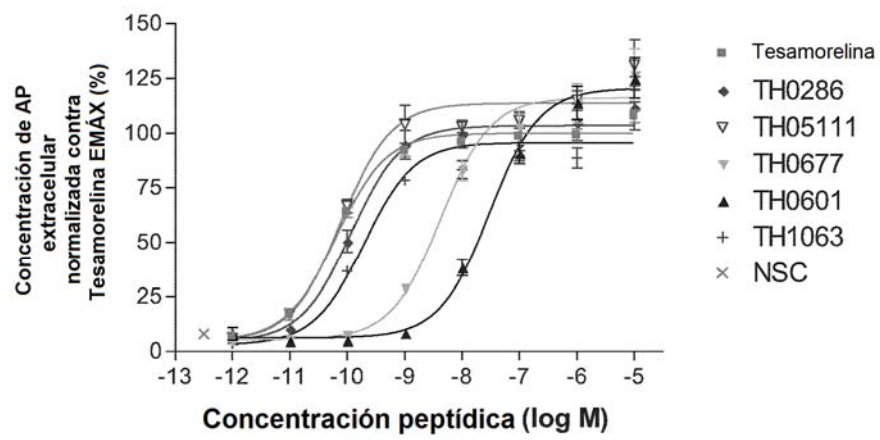


FIGURA 4

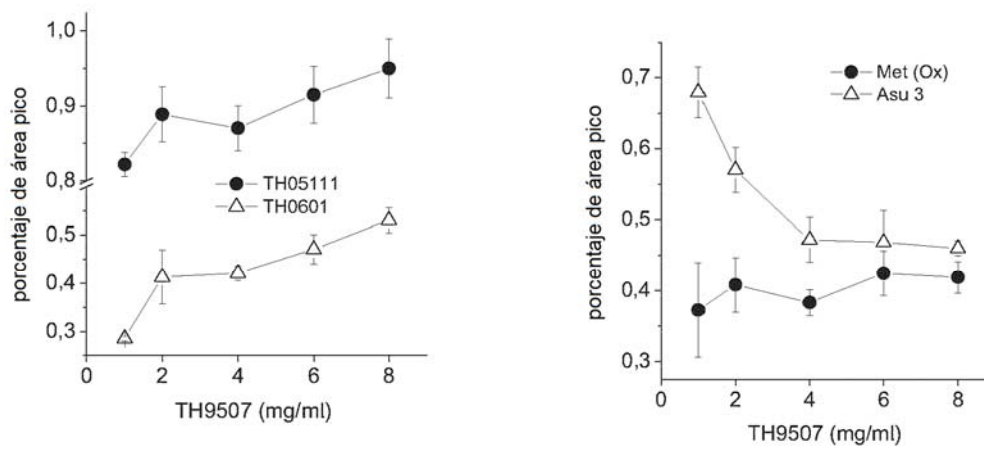


FIGURA 5

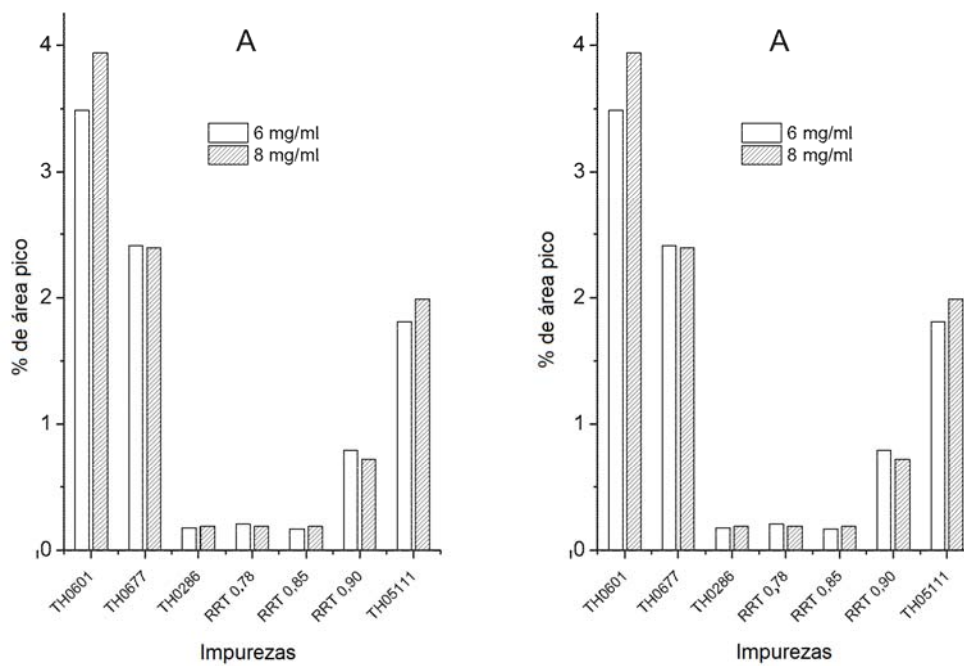


FIGURA 6

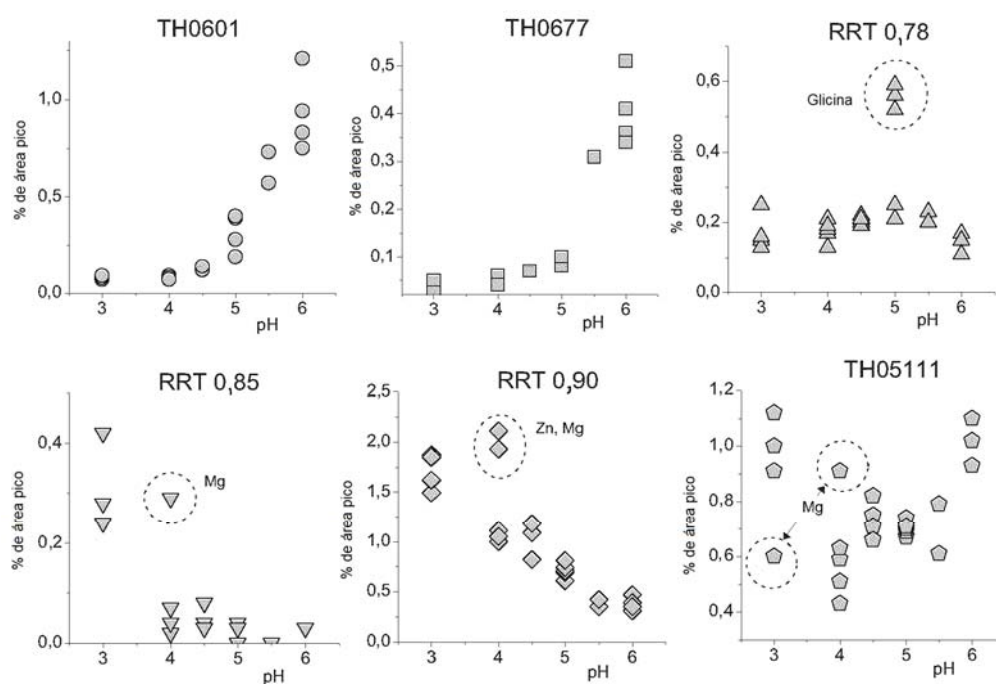


FIGURA 7

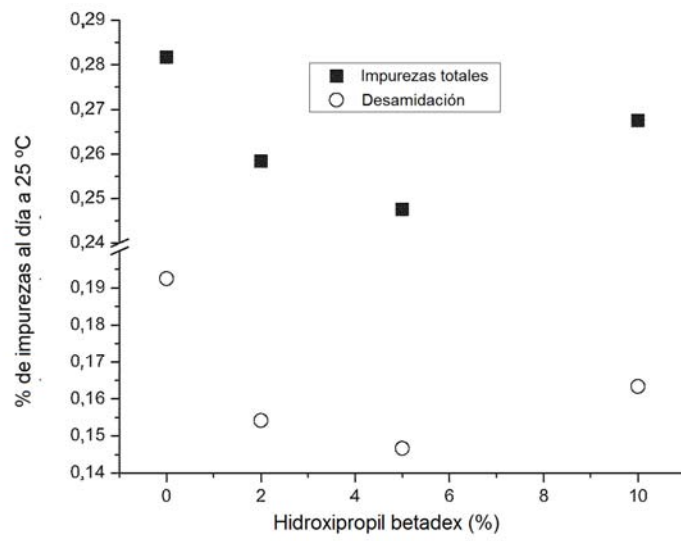


FIGURA 8

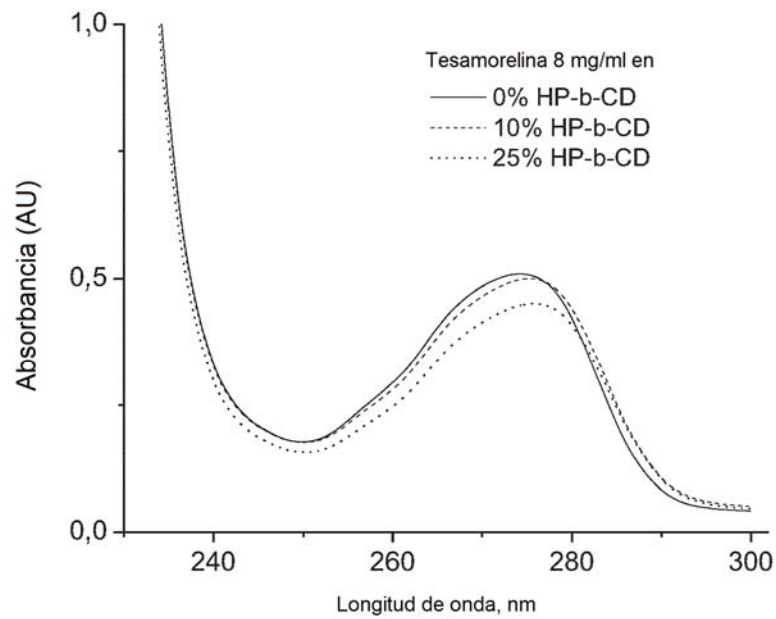


FIGURA 9A

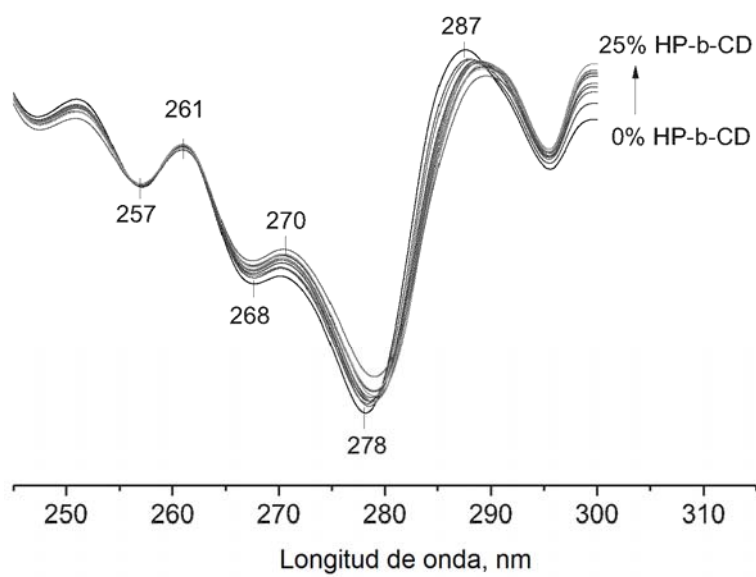


FIGURA 9B

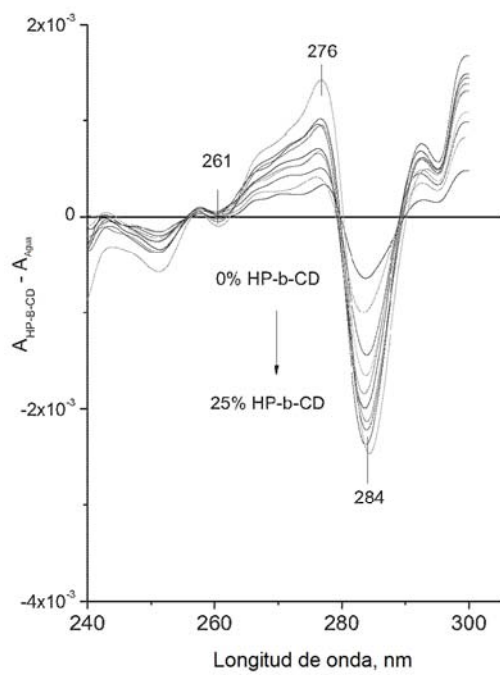


FIGURA 10

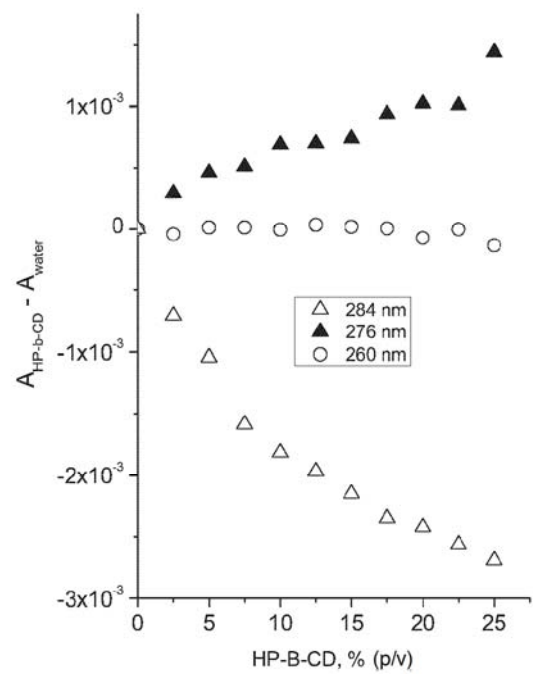


FIGURA 11

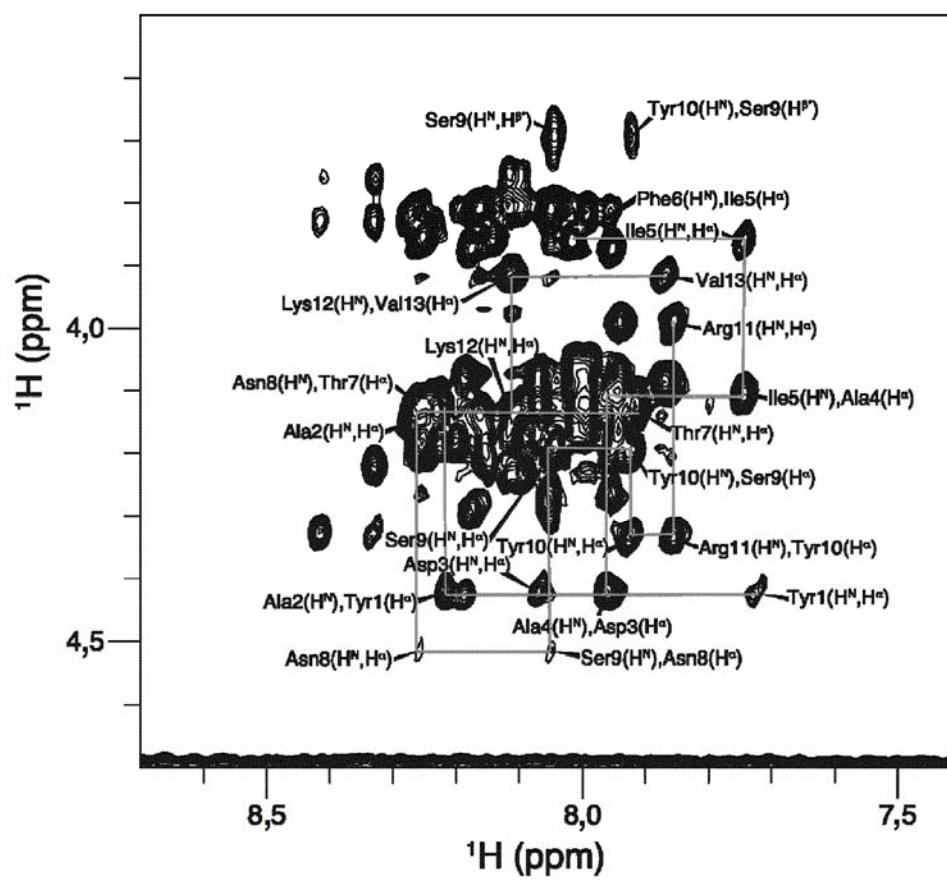
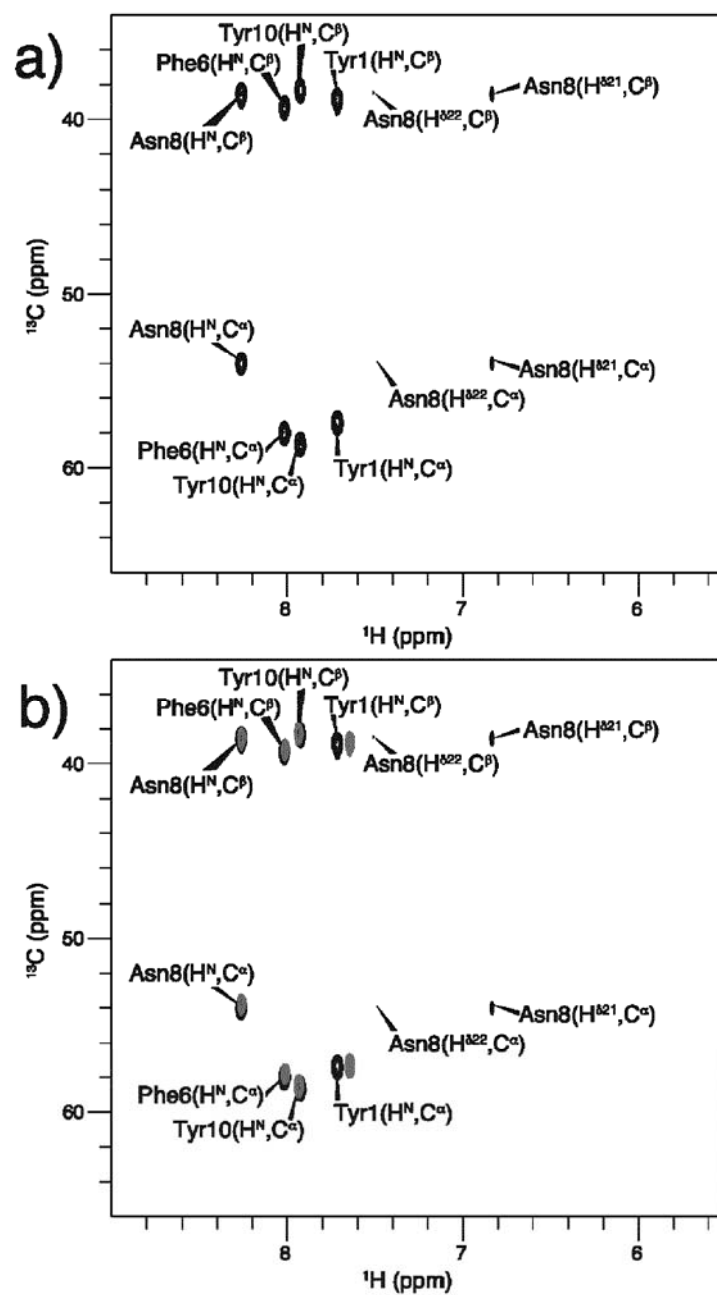


FIGURA 12

**FIGURA 13**

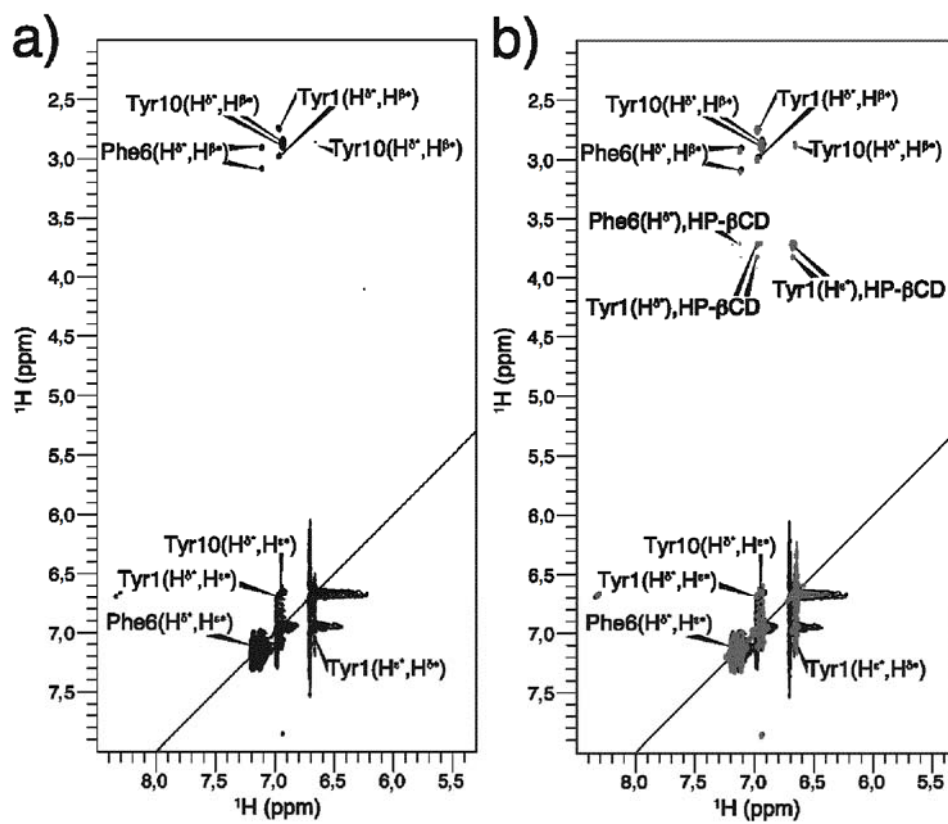


FIGURA 14

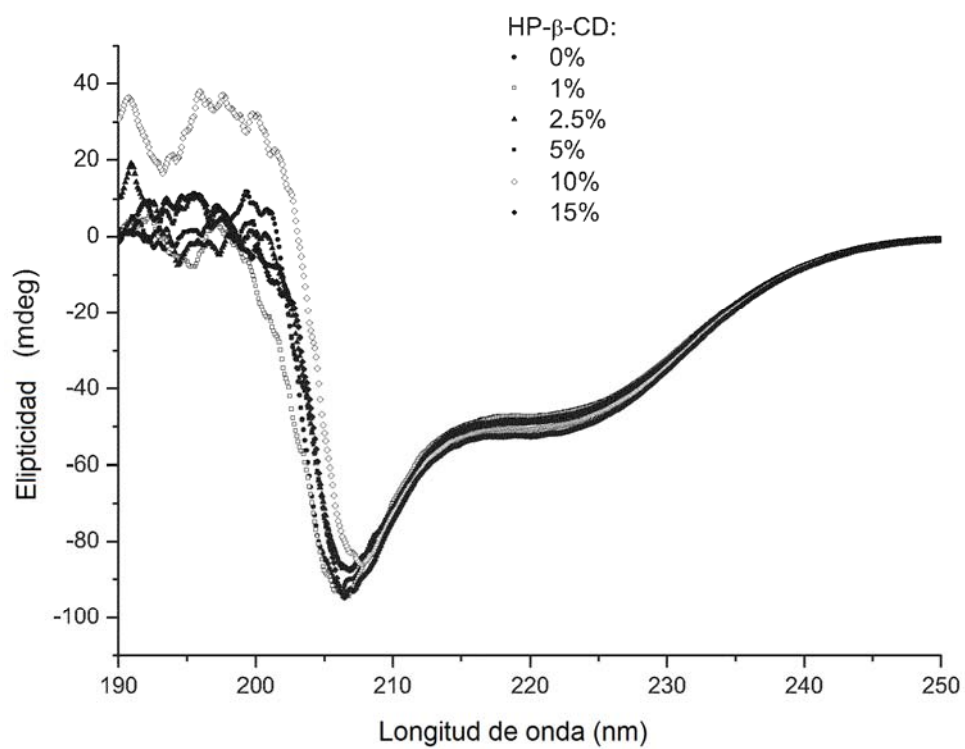


FIGURA 15

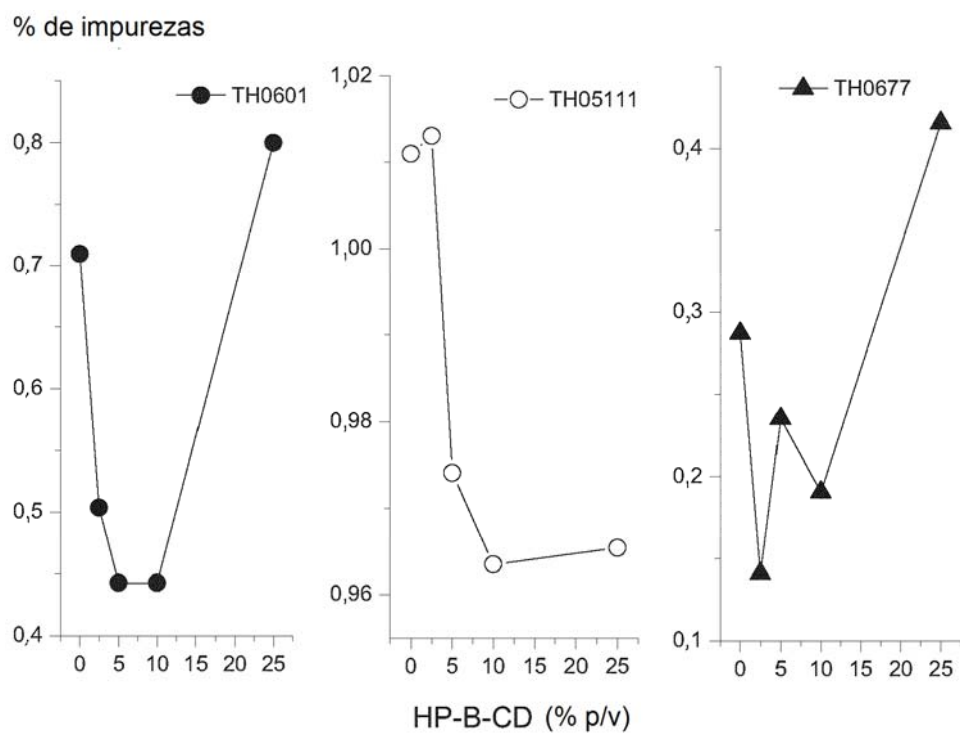


FIGURA 16

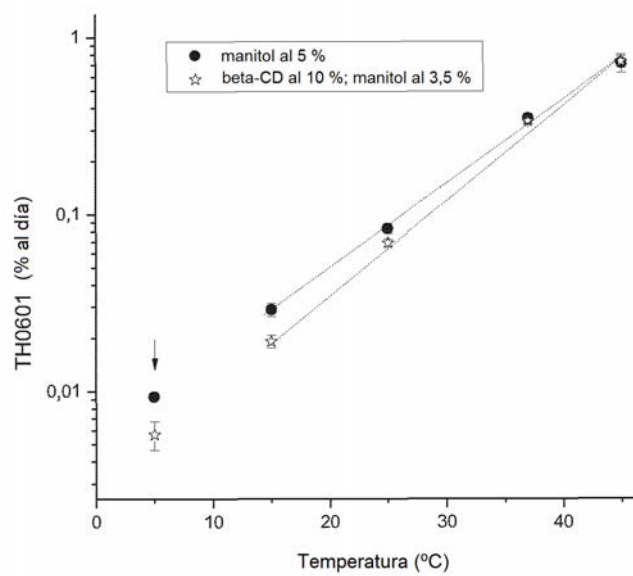


FIGURA 17

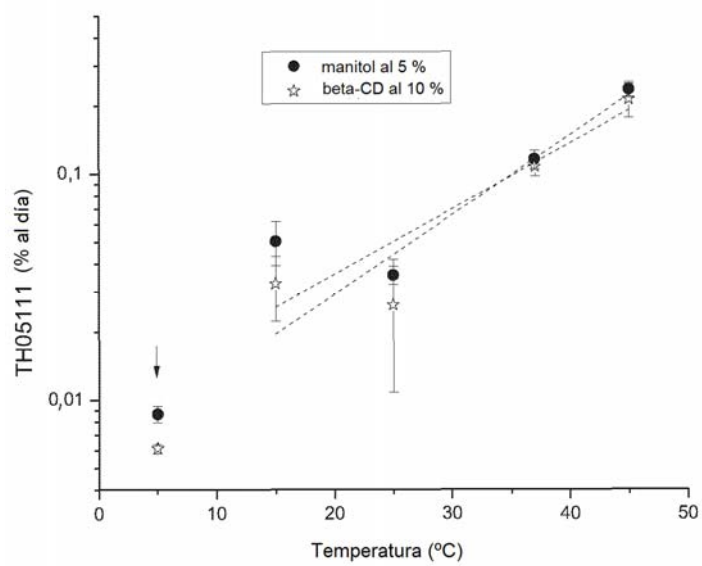


FIGURA 18

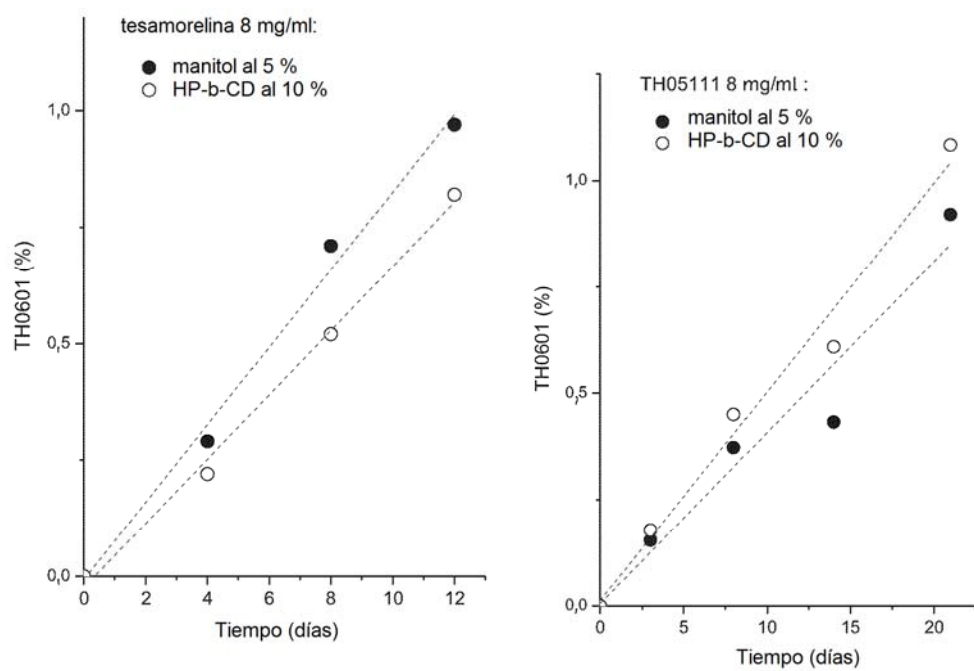


FIGURA 19

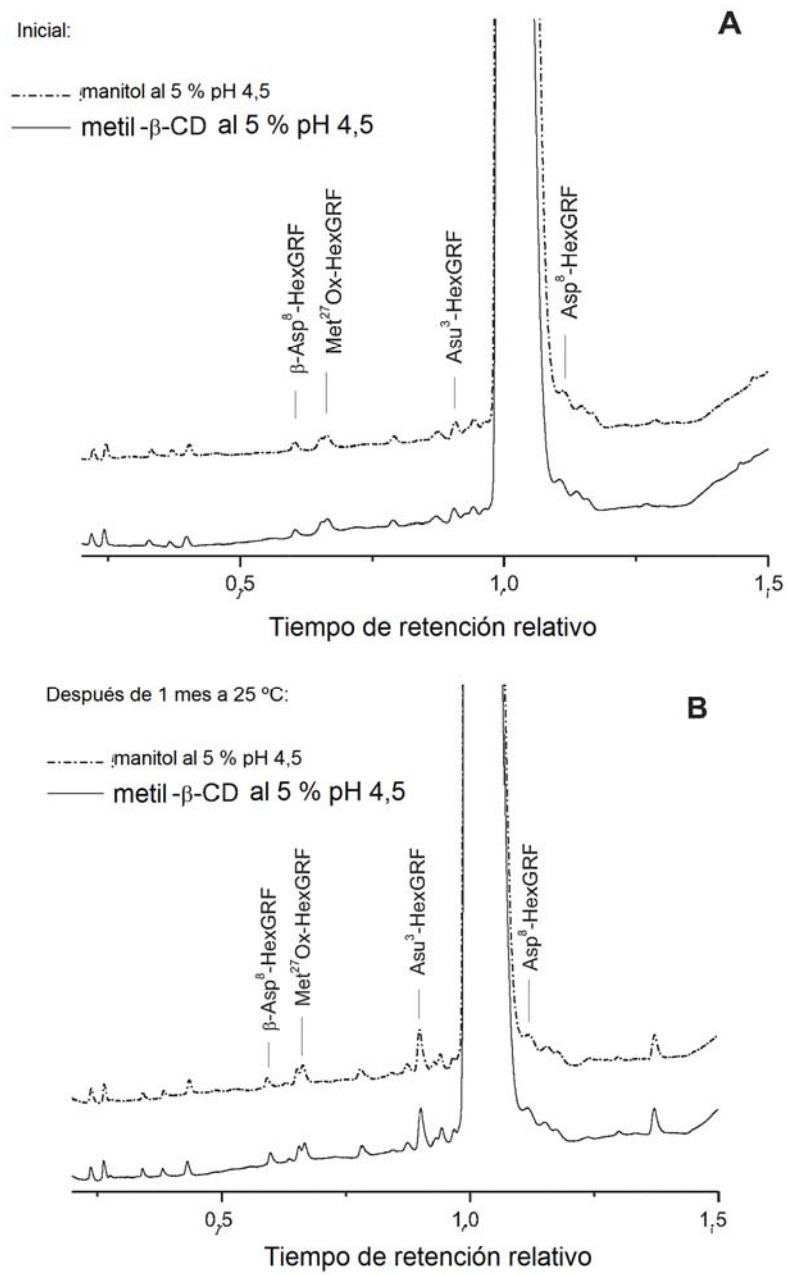


FIGURA 20

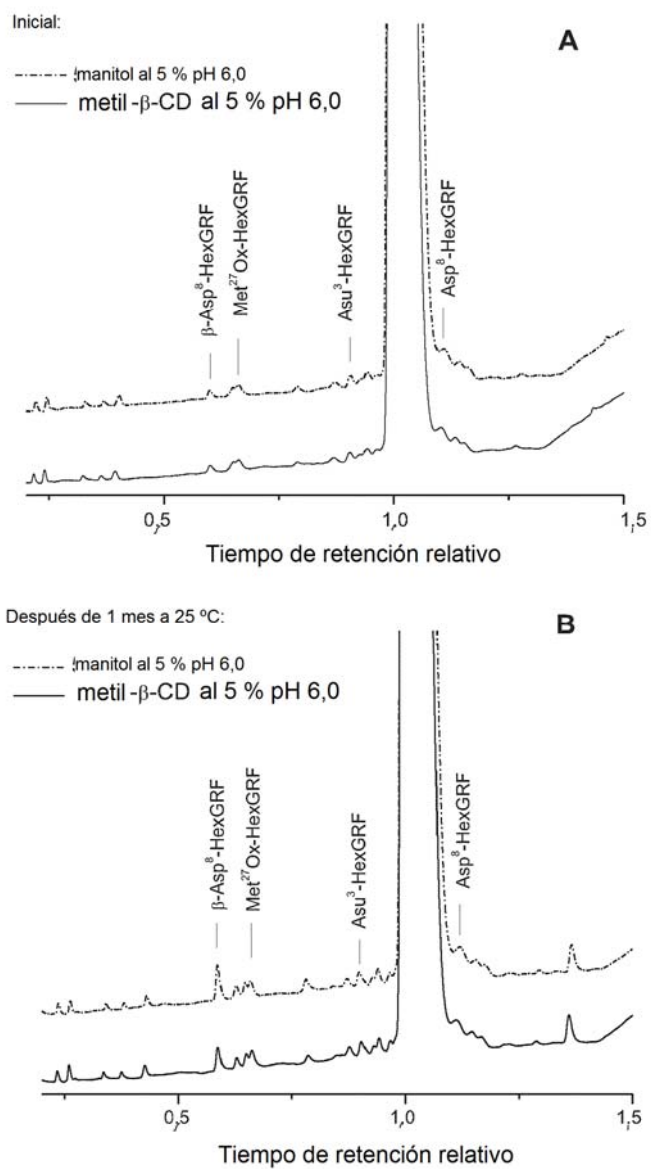


FIGURA 21