

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 979**

51 Int. Cl.:

A61K 38/27 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
C07K 14/61 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2013 PCT/KR2013/002660**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13147559**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2013 E 13769126 (7)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2830649**

54 Título: **Formulación líquida de conjugado de hormona de crecimiento humana altamente concentrada de acción prolongada**

30 Prioridad:

30.03.2012 KR 20120033580

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LIM, HYUNG KYU;
KIM, HYUN UK;
HONG, SUNG HEE;
BAE, SUNG MIN y
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 713 979 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulación líquida de conjugado de hormona de crecimiento humana altamente concentrada de acción prolongada

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una formulación líquida de un conjugado de hormona de crecimiento humana altamente concentrada de acción prolongada, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada en el que la hormona de crecimiento humana (hGH) se une a una región Fc de inmunoglobulina, un conservante, y un estabilizante libre de albúmina, comprendiendo dicho estabilizante un tampón, un tensioactivo no iónico, un alcohol azúcar, y cloruro sódico como agente isotónico, y un procedimiento para preparar el mismo.

Técnica antecedente

10 La hormona de crecimiento humana (a la que se hace referencia de aquí en adelante como 'hGH') es una hormona polipeptídica que consiste en 191 aminoácidos que tiene un peso molecular de aproximadamente 22.000 Da que se secreta en la glándula pituitaria anterior. Se ha utilizado una hormona de crecimiento humana para el tratamiento principalmente del enanismo pituitario pediátrico. Anteriormente, se utilizaba la hGH extraída de la glándula pituitaria humana, pero su suministro es limitado. Por lo tanto, solo se podía tratar un número de personas muy limitado. También, después de informarse de la incidencia del trastorno neurológico degenerativo de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob en algunos de los pacientes que recibían la hGH recolectada de la glándula pituitaria, el uso de hGH extraída de glándulas pituitarias se prohibió. Actualmente, con el desarrollo de técnicas de modificación genética, es posible la producción de hGH en *E. coli* y levaduras. Por lo tanto, las medicinas de hGH biosintéticas producidas por modificación genética están disponibles en el mercado superando los ensayos toxicológicos y clínicos y siendo aprobadas en varios países desde 1985.

15 En general, los polipéptidos como la hGH tienen baja estabilidad y por lo tanto se desnaturaliza fácilmente. También se degrada fácilmente por las proteasas del suero y se eliminan por el riñón o el hígado. Por lo tanto, los fármacos proteicos que contienen polipéptidos como ingrediente farmacéutico tienen que administrarse a los pacientes frecuentemente con el fin de mantener su concentración y título en la sangre. Sin embargo, como los fármacos proteicos a menudo se administran en forma de inyección, la inyección frecuente de fármacos proteicos para mantener la concentración sanguínea óptima de los polipéptidos activos produce mucho dolor a los pacientes. Para resolver estos problemas se han hecho muchos intentos para aumentar la estabilidad del fármaco proteico en la sangre y mantener su concentración sanguínea a un alto nivel durante un largo periodo de tiempo, con el fin de maximizar los efectos terapéuticos de la medicina. Para el desarrollo de una formulación de acción prolongada del fármaco proteico, se tiene que estar seguro de que la formulación aumenta la estabilidad del fármaco proteico a la vez que se mantienen un título alto del propio fármaco, sin producir ninguna respuesta inmunitaria en los pacientes.

20 Como un procedimiento para estabilizar las proteínas y evitar el contacto con las proteasas y la pérdida renal, se ha añadido químicamente un polímero altamente soluble tal como el polietilenglicol (PEG) a la superficie de los fármacos proteicos. El PEG se une a un sitio específico de una proteína diana o a varios sitios no específicamente y aumenta la solubilidad de la proteína, estabilizando de esta manera la proteína. También, el PEG es eficaz en la prevención de la hidrólisis de la proteína y no produce ningún efecto secundario particular. Aunque la unión con PEG puede aumentar la estabilidad de la proteína, el título de proteína fisiológicamente activo se vuelve significativamente bajo, y según aumenta el peso molecular del PEG, se reduce su reactividad con la proteína, reduciendo de esta manera el rendimiento.

25 Como un procedimiento alternativo para aumentar la estabilidad *in vivo* de las proteínas fisiológicamente activas, se ha desarrollado un procedimiento de producción de proteínas de fusión conectando un gen que codifica una proteína con alta estabilidad en la sangre y un gen de la proteína fisiológicamente activa mediante recombinación genética y cultivo de las células animales que se transforman con los genes recombinantes. Por ejemplo, se puede unir albúmina o un fragmento de la misma, que se sabe que es altamente eficaz en el aumento de la estabilidad proteica a una proteína fisiológicamente activa dirigida mediante recombinación genética para producir una proteína de fusión (Publicaciones de Patente Internacional N.º WO 93/15199 y WO 93/15200, Publicación de Patente Europea EP 413.622).

30 Además, como un procedimiento para la utilización de inmunoglobulinas, la Patente de EE. UU. N.º 5.045.312 desvela que cuando la hGH se conjuga con seroalbúmina bovina (BSA) o una inmunoglobulina murina utilizando un agente de entrecruzamiento, la actividad del conjugado de hGH aumenta en comparación con la hormona de crecimiento sin modificar. Sin embargo, la patente anterior solo desvela compuesto de bajo peso molecular, tales como carbodiimida o glutaraldehído como agente de entrecruzamiento. Cuando se utilizan estos agentes de entrecruzamiento de bajo peso molecular, es difícil obtener composiciones homogéneas debido a la conjugación no específica, y pueden ser tóxicos *in vivo*. Además, la patente a la que se hace referencia anteriormente simplemente desvela el aumento de actividad de hormona de crecimiento por acoplamiento químico, pero no describe el efecto del acoplamiento químico en la actividad de otros tipos de fármacos polipéptidos, sin entender la correlación con la estabilidad de las proteínas tal como el aumento de durabilidad y la semivida sérica.

Recientemente, la Patente Coreana N.º 10-0567902 (Physiologically Active Polypeptide Conjugate Having Improved *In vivo* Durability) y la Patente Coreana N.º 10-0725315 (Protein Complex Using An Immunoglobulin Fragment And Method For The Preparation Thereof) desvelan conjugados preparados mediante la unión de polipéptidos fisiológicamente activos con una región Fc de inmunoglobulina y un polímero no peptídico, como formulaciones de acción prolongada de fármacos proteicos que permite tanto una mínima reducción de la actividad proteica como un aumento de la estabilidad proteica. De acuerdo con estos procedimientos, se puede utilizar la hGH como un polipéptido fisiológicamente activo para preparar un conjugado de hGH de acción prolongada. Para la comercialización del fármaco que contiene conjugados de hGH de acción prolongada, es esencial evitar los cambios fisicoquímicos tales como desnaturalización, agregación, adsorción, o hidrólisis debido a la degradación inducida por la luz, calor o impurezas en los aditivos durante el procedimiento de almacenamiento y transporte, mientras que se mantenga el efecto *in vivo* de la hGH. En comparación con una hGH polipeptídica, un conjugado de hGH de acción prolongada tiene un tamaño mayor y un aumento de peso molecular, y por lo tanto existe una dificultad en la estabilización el conjugado.

En la industria farmacéutica, la estabilidad proteica baja en un líquido ha sido una imitación. Por lo tanto, las proteínas se tienen que secar por congelación para resolver el problema de la estabilidad. Aunque una formulación proteica secada por congelación tiene la ventaja de mantener la estabilidad durante un largo periodo de tiempo, cuando se inyecta tiene que reformularse con auxiliares de disolución. También, cuando se reformula con el auxiliar de disolución en el secado por congelación, existían desventajas por pérdida de actividad a menudo debido a la formación de polímeros, etc., y el coste del tiempo necesario para el procedimiento de secado por congelación también era alto. Con el fin de superar estas limitaciones, las Publicaciones de Patente Internacional N.º WO 93/019776 y N.º WO 94/003198 desvelan una formulación líquida estable de hGH. Para el desarrollo de formulaciones de hGH líquidas estables, es importante controlar la degradación de la hGH tal como la regulación de la tasa de producción de productos de degradación por desamidación, formación de polímeros y proceso de oxidación. La temperatura, pH y aditivos de la formulación líquida afectan la tasa de producción del producto de degradación, pero la formulación que pueda estabilizar todos los tipos de proteínas permitiendo su aplicación clínica no se conoce todavía. Además, la formulación líquida que tiene un efecto estabilizante para la proteína específica a menudo no es aplicable para la estabilización de otras proteínas. A este respecto, las referencias anteriores desvelan que se necesita primero llevar a cabo la selección y combinación de factores y aditivos que pueden minimizar la tasa de producción de un producto de degradación de la proteína de manera anticipada para maximizar la estabilidad de la hGH proteica en forma líquida.

Además, las diferentes proteínas se pueden inactivar gradualmente en diferentes proporciones y condiciones durante el almacenamiento debido a la diferencia de sus propiedades químicas. Es decir, los efectos de un estabilizante para aumentar el periodo de almacenamiento no son los mismos para diferentes proteínas. Por esta razón. Los estabilizantes utilizados para la estabilidad en el almacenamiento tienen distintas relaciones, concentraciones y tipos adecuados de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de una proteína diana. Sin embargo, cuando se utilizan diferentes estabilizantes simultáneamente, puede producir resultados contrarios debido a la interacción competitiva entre ellos y efectos secundarios. Además, como las propiedades y concentración de la proteína almacenada pueden cambiar durante su almacenamiento, los estabilizantes pueden presentar efectos diferentes a los esperados. Por lo tanto, la estabilización de una proteína en solución conlleva muchos esfuerzos y precauciones.

Particularmente, como los conjugados de hGH de acción prolongada con un aumento de la durabilidad y estabilidad *in vivo* se preparan uniendo una hGH peptídica fisiológicamente activa con regiones Fc de inmunoglobulina y tienen un peso molecular y volumen significativamente diferentes de otras hGH típicas, necesitan una composición especial para la estabilización de la proteína. También cada uno de entre la hGH peptídica fisiológicamente activa y la región Fc de inmunoglobulina tiene diferentes propiedades fisicoquímicas, ambas necesitan estabilizarse simultáneamente. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, los diferentes péptidos o proteínas se pueden inactivar gradualmente en diferentes proporciones y condiciones durante el almacenamiento debido a la diferencia en sus propiedades fisicoquímicas. También, cuando se utilizan simultáneamente estabilizantes adecuado para cada péptido o proteína, pueden causar resultados contrarios debido a la interacción competitiva entre ellos y los efectos secundarios. Además, como las propiedades y concentración de la proteína almacenada pueden cambiar durante su almacenamiento, los estabilizantes pueden presentar diferentes efectos de los esperados. Por lo tanto, para un conjugado de hGH de acción prolongada, es difícil encontrar una formulación estabilizante que pueda estabilizar ambos, la hGH peptídica fisiológicamente activa y la región Fc de inmunoglobulina simultáneamente.

El documento WO 2012/068779 A2 describe una formulación líquida libre de albúmina de un conjugado de hormona de crecimiento humana (hGH) de acción prolongada que comprende la hormona de crecimiento humana unida a una región Fc de inmunoglobulina.

Divulgación de la invención

Problema técnico

En un esfuerzo para encontrar una composición para aumentar la estabilidad de una formulación líquida de un conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada altamente concentrado de manera que se

5 pueda almacenar durante un largo periodo de tiempo sin preocuparse por la contaminación vírica y para reducir la precipitación proteica, los presentes inventores han descubierto que cuando se utiliza un estabilizante comprende un tampón, un alcohol azúcar, un tensioactivo no iónico, y cloruro sódico como agente isotónico, aumentaba la estabilidad de un conjugado de hGH de acción prolongada concentrado, y por lo tanto se podía preparar una formulación líquida estable y barata. Se confirmó que, con la adición de un conservante, el conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado podía almacenarse establemente, completando de esta manera la presente invención.

Solución al problema

10 La presente invención proporciona una formulación líquida de un conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada altamente concentrado, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada en la que la hormona de crecimiento humana hGH está unida a una región Fc de inmunoglobulina, un conservante, y un estabilizante libre de albúmina, comprendiendo dicho estabilizante un tampón, un tensioactivo no iónico, un alcohol azúcar y cloruro sódico como agente isotónico.

15 También se proporciona un procedimiento para la preparación de una formulación líquida de la invención, que comprende la mezcla de un conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada con un conservante y un estabilizante, comprendiendo dicho estabilizante un tampón, un alcohol azúcar, un surfactante no iónico y cloruro sódico como agente isotónico.

Efectos ventajosos de la invención

20 La formulación líquida del conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado de la presente invención comprende un estabilizante que contiene un tampón, un alcohol azúcar, un tensioactivo no iónico, y cloruro sódico como agente isotónico, pero no tiene una seroalbúmina humana y cualquier factor potencialmente perjudicial para el cuerpo. Por lo tanto, no existe el problema de contaminación vírica. Además, la presente formulación permite una alta estabilidad en el conjugado de hGH de acción prolongada que se prepara uniendo la hGH polipeptídica y la región Fc de inmunoglobulina, teniendo de esta manera un mayor peso molecular en comparación con la de tipo silvestre y aumentando la durabilidad *in vivo*. También, la formulación líquida es estable incluso cuando comprende adicionalmente un conservante y, por lo tanto, se puede utilizar como una formulación para su administración múltiple.

Breve descripción de los dibujos

30 La Figura 1 demuestra los resultados de un ensayo de estabilidad acelerado de una formulación líquida de conjugado de hGH de acción prolongada que comprende 20 mM de tampón de acetato sódico (pH 5,6), 150 mM de cloruro sódico, un 5 % de manitol y un 0,005 % de polisorbato 80 durante el almacenamiento del mismo, de acuerdo con la concentración de conjugado de hGH de acción prolongada, que presenta el cromatograma de IE-HPLC para analizar la estabilidad de la muestra. Se demuestra que las formulaciones líquidas de conjugado de hGH de acción prolongada a una concentración baja y una concentración alta mantienen un nivel de estabilidad similar.

35 La Figura 2 demuestra los resultados de un ensayo de estabilidad acelerado de una formulación líquida de conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado que comprende adicionalmente 9 mg/ml de alcohol bencílico o 3 mg/ml de m-cresol además de 20 mM de acetato sódico (pH 5,6), 150 mM de cloruro sódico, un 5 % de manitol y un 0,005 % de polisorbato 80 durante el almacenamiento del mismo, de acuerdo con la concentración del conjugado de hGH de acción prolongada, que presenta el cromatograma de IE-HPLC para el análisis de la estabilidad de la muestra. Demuestra que las formulaciones líquidas de conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado al que se añade un conservante tal como el alcohol bencílico mantiene una estabilidad similar que lo que no tienen conservantes (control).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

45 En una realización, la presente invención proporciona una formulación líquida de un conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada altamente concentrado, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada en un conservante, en el que la hormona de crecimiento humana (hGH) está unida a una región Fc de inmunoglobulina, y un estabilizante libre de albúmina, comprendiendo dicho estabilizador un tampón, un tensioactivo no iónico, un alcohol azúcar y cloruro sódico como agente isotónico.

50 La formulación líquida del conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado de la presente invención comprende un estabilizante libre de albúmina, que asegura una estabilidad en el conjugado de hGH de acción prolongada sin riesgo de contaminación vírica. Además, es una formulación simple que tiene una estabilidad de almacenamiento excelente, y por lo tanto permite una provisión más barata de fármacos en comparación con otros estabilizadores o una formulación secada por congelación. También, como la formulación líquida de la presente invención comprende el conjugado de hGH de acción prolongada que tiene una durabilidad *in vivo* aumentada en comparación con la proteína tipo silvestre, puede mantener una actividad proteica *in vivo* durante un largo periodo de tiempo en comparación con otras formulaciones de hGH comunes, y por lo tanto se puede utilizar como una

formulación farmacológicamente eficaz que asegura una alta estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado.

5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "conjugado de hGH de acción prolongada" se refiere a un conjugado en el que una hormona de crecimiento humana (hGH) peptídica fisiológicamente activa está unida a una región Fc de inmunoglobulina cuya actividad fisiológica tiene un aumento de duración *in vivo* en comparación con la hGH de tipo silvestre. La expresión 'de acción prolongada', como se utiliza en el presente documento significa que la actividad fisiológica tiene una duración más larga que un hGH de tipo silvestre. Como se utiliza en el presente documento, el término 'conjugado' se refiere a una hGH que está acoplada a una región Fc de inmunoglobulina.

10 Como se utiliza en el presente documento, la expresión 'hormona de crecimiento humana (hGH)' se refiere a una hormona peptídica que estimula el crecimiento, la reproducción celular y la regeneración en seres humanos. La información de la secuencia de hGH se puede obtener de una base de datos común tal como NCBI GenBank. Además, el ámbito de hGH en la presente invención incluye una proteína que posee una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia del 70 % o más, preferentemente del 80 % o más, más preferentemente del 90 % o más, incluso más preferentemente del 95 % o más, y más preferentemente del 98 % o más respecto a la secuencia de aminoácidos de una hormona de crecimiento humana de tipo silvestre, a condición de que tenga la actividad de la hGH. También, a condición de que su actividad biológica no cambie significativamente, se puede utilizar en la presente invención cualquier mutante derivado de una hGH de tipo silvestre por sustitución, eliminación o inserción de restos de aminoácidos.

20 La hGH útil en la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos de una hGH, su variante, su derivado, o fragmentos de la misma.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión 'variante de hGH' se refiere a un péptido que tiene una o más secuencias de aminoácidos diferentes de las de la hGH de tipo silvestre a la vez que presenta actividad de hGH. La variante de hGH se puede preparar por sustitución, adición, eliminación, o modificación de algunos aminoácidos de una hGH de tipo silvestre o una combinación de las mismas.

25 Como se utiliza en el presente documento, la expresión 'derivado de hGH' se refiere a un péptido que tiene al menos un 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con una hGH de tipo silvestre y una actividad de hGH, en la que algunos grupos de restos de aminoácidos se han sustituido químicamente (por ejemplo, alfa-metilación, alfa-hidroxilación), eliminado (por ejemplo, desaminación), o modificado (por ejemplo, N-metilación).

30 Como se utiliza en el presente documento, la expresión 'fragmento de hGH' se refiere a un péptido en el que se añaden o eliminan uno o más aminoácidos en el extremo N o el extremo C de hGH mientras mantenga la actividad de hGH, y los aminoácidos añadidos pueden no ser aminoácidos de origen natural (por ejemplo, aminoácidos tipo D).

35 Además, la hGH utilizada en la presente invención puede obtenerse de una proteína nativa o recombinante. Preferentemente, es la hGH recombinante que se prepara utilizando *E. coli* como célula huésped, pero no se limita a esta.

40 Como se utiliza en el presente documento, la expresión 'región Fc de inmunoglobulina' se refiere a una parte de la inmunoglobulina excluyendo las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera, la región constante de cadena pesada (CH₁) y la región constante 1 de cadena ligera (CL₁) de la inmunoglobulina. La región Fc de inmunoglobulina puede ser la región constante 2 de cadena pesada (CH₂) y la región constante 3 de cadena pesada (CH₃) de una inmunoglobulina y puede comprender adicionalmente la región bisagra en la región constante de cadena pesada, pero no se limita a esto. También la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser una región Fc extendida que comprende una parte o toda la región constante 1 de cadena pesada (CH₁) y/o la región constante 1 de cadena ligera (CL₁) excepto las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, a condición de que tenga sustancialmente el mismo efecto o mejorado que la proteína de tipo silvestre. También, la región Fc de inmunoglobulina puede ser un fragmento en el que se ha eliminado una parte considerablemente larga de la secuencia de aminoácidos correspondiente con la CH₂ y/o CH₃. Es decir, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede comprender 1) un dominio CH₁, un dominio CH₂ un dominio CH₃ y un dominio CH₄, 2) un dominio CH₁ y un dominio CH₂, 3) un dominio CH₁ y un dominio CH₃, 4) un dominio CH₂ y un dominio CH₃, 5) una combinación de uno o más dominios y una región bisagra de inmunoglobulina (o una parte de la región bisagra), y 6) un dímero de un dominio o las regiones constantes de cadena pesada y una región constante de cadena ligera, pero no se limita a esto.

55 La región Fc de inmunoglobulina de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos nativa y una secuencia de aminoácidos derivada de la misma (mutante) La secuencia de aminoácidos derivada se refiere a la secuencia que tiene una secuencia diferente de la secuencia nativa por eliminación, inserción, sustitución no conservadora o conservador de uno o más restos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa, o combinaciones de la misma. Por ejemplo, en la Fc de IgG, los restos de aminoácidos de las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322, o 327 a 331 que se sabe que son importantes para la unión proteica pueden ser dianas adecuadas para la modificación.

También, se pueden utilizar otros tipos de derivados, incluyendo los derivados en los que se ha eliminado una región capaz de formar un enlace disulfuro, unos pocos restos de aminoácidos en el extremo N de una Fc nativa, o se ha añadido un resto de metionina en el extremo N de una Fc nativa. Además, con el fin de eliminar una función de efector, se puede eliminar un sitio de unión al complemento, por ejemplo, un sitio de unión a C1q o sitio de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). Las técnicas para preparar dichos derivados de la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se desvelan en los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478.

La sustitución de aminoácidos en las proteínas y péptidos, que no cambian la actividad general de la proteína, se conocen en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Los cambios que se producen más comúnmente son Ala/Ser, Val/ Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, en ambas direcciones. En algunos casos, la región Fc se puede modificar por fosforilación, sulfación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, y similares. Los derivados de Fc mencionados anteriormente demuestran la misma actividad biológica de la región Fc de la presente invención, y tiene una estabilidad estructural contra el color, pH y similares.

Además, estas regiones Fc se pueden obtener de proteínas intactas aisladas de seres humanos y otros animales incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o pueden ser recombinantes obtenidas de células animales transformadas o microorganismos o derivados de las mismas. Aquí, el procedimiento para la obtención de regiones Fc de la inmunoglobulina nativa puede incluir el aislamiento de las inmunoglobulinas completas del cuerpo humano o animal y tratarlas con una proteasa. Cuando se utiliza la papaína para digerir inmunoglobulinas, se escinden en las regiones Fab y Fc, y cuando se utiliza pepsina, la inmunoglobulina se escinde en pF'c y F(ab')₂. Estos fragmentos se pueden separar utilizando una cromatografía de exclusión por tamaño para aislar Fc o pF'c. Preferentemente, una región Fc derivada de seres humanos es una región Fc de inmunoglobulina recombinante obtenida de un microorganismo.

Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede estar en forma de cadenas de azúcar nativas, cadenas de azúcar más largas que la forma nativa, cadenas de azúcar más cortas que la forma nativa, o una forma desglicosiladas. La extensión o retirada de las cadenas de azúcar de Fc de inmunoglobulina se puede hacer utilizando procedimientos comunes en la técnica e incluyen procedimientos químicos, procedimientos enzimáticos, y procedimientos de modificación genética utilizando un microorganismo. La retirada de las cadenas de azúcar de una región Fc de inmunoglobulina da como resultado un descenso brusco de su afinidad de unión al C1q del primer componente de complemento C1 y por lo tanto se reduce o elimina la toxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo o la citotoxicidad dependiente del complemento, y se puede evitar la presencia de respuestas inmunitarias innecesarias *in vivo*. A este respecto, la región Fc de inmunoglobulina desglicosilada o aglicosilada es una forma más preferible de vehículo farmacológico para el objetivo de la presente invención.

Como se utiliza en la presente invención, el término 'desglicosilación' se refiere a la retirada de restos de azúcar de la región Fc utilizando una enzima, y el término 'aglicosilación' se refiere al estado no glicosilado de la región Fc que se produce a partir de una procarionota, preferentemente *E. coli*.

Entre tanto, la región Fc de inmunoglobulina se puede derivar de seres humanos u otros animales incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas, y cobayas, y preferentemente de seres humanos.

Además, la región Fc de inmunoglobulina puede derivarse de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o los preparados por una combinación o híbridos de los mismos. Preferentemente, se deriva de IgG o IgM, que están entre las proteínas más abundantes de la sangre humana, y más preferentemente de la IgG, que se sabe que aumenta la semivida de la unión del ligando a la proteína.

Entre tanto, el término 'combinación', como se utiliza en el presente documento, se refiere a una conjugación entre un polipéptido que codifica regiones Fc de inmunoglobulinas de cadena sencilla. En la presente invención, se pueden utilizar distintos tipos de híbridos. Es decir, un híbrido de dominios puede estar compuesto por uno a cuatro dominios seleccionados de entre el grupo que consiste en CH₁, CH₂, CH₃ y CH₄ de Fc de IgG, Fc de IgM, Fc de IgA, Fc de IgE y Fc de IgD, y puede comprender una región bisagra.

El término 'híbrido', como se utiliza en el presente documento, se refiere a cuando una región Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla posee las secuencias que codifican dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulinas de diferentes orígenes. En la presente invención, la presente invención, se pueden utilizar distintos tipos de híbridos. Es decir, un híbrido de dominios puede estar compuesto de uno a cuatro dominios seleccionados de entre el grupo que comprende CH₁, CH₂, CH₃ y CH₄ de Fc de IgG, Fc de IgM, Fc de IgA, Fc de IgE y Fc de IgD, y puede comprender una región bisagra.

Entre tanto, la IgG también se puede dividir en subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y una combinación o híbrido de las mismas también es posible en la presente invención, preferentemente las subclases IgG2 e IgG4, y más preferentemente la región Fc de IgG4 que carece de una función efectora tal como de citotoxicidad dependiente de complemento.

En otras palabras, la región Fc de inmunoglobulina más preferida del conjugado de la presente invención es una región Fc no glicosilada derivada de IgG4 humana. La región Fc derivada de seres humanos actúa como un

antígeno en el cuerpo humano y por lo tanto es preferible a una región Fc derivada de un no humano que pueda producir respuestas inmunitarias no deseables tales como la producción de nuevos anticuerpos contra el antígeno.

5 El conjugado de hGH de acción prolongada de la presente invención se puede preparar combinando una hGH preparada de una forma nativa o recombinante por cualquier procedimiento y una región Fc de inmunoglobulina preparada tratando la IgG de tipo silvestre con ciertas proteasas o producida a partir de una célula transformada utilizando una técnica de recombinación.

10 Como el procedimiento de combinación utilizado para este fin, se puede preparar el conjugado mediante entrecruzamiento de una hGH y una región Fc de inmunoglobulina utilizando un polímero no peptídico o producida como una proteína de fusión en el que la hGH y la región Fc de inmunoglobulina se unen utilizando una técnica de recombinación. Es decir, el conjugado se puede producir en una forma en la que la hormona de crecimiento humana y la Fc de inmunoglobulina se unen mediante un engarce no peptídico, o en forma de proteína de fusión de hGH y Fc de inmunoglobulina. La proteína de fusión comprende una forma en la que la hGH y la Fc de inmunoglobulina se combinan mediante un engarce peptídico, pero no se limita a esto.

15 La expresión 'polímero no peptídico', como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polímero biocompatible en el que dos o más unidades de repetición se combinan y las unidades de repetición se conectan entre ellas por cualquier conjugación, pero no un enlace peptídico. En la presente invención, se puede utilizar un polímero no peptídico de manera intercambiable con el engarce no peptídico.

20 El polímero no peptídico utilizado para el entrecruzamiento se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en un polímero biodegradable incluyendo polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímero etilenglicol-propilenglicol, polioli polioxietilado, alcohol polivinílico, un polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, ácido poliláctico (PLA) o ácido poliláctico-glicólico (PLGA, un polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico, y una combinación de los mismos, y preferentemente polietilenglicol (PEG), pero no se limita a estos. Además, sus derivados que ya se conocen en la técnica y derivados que se pueden preparar fácilmente por un procedimiento conocido en la técnica puede incluirse en el ámbito de la presente invención.

25 Para la preparación del conjugado de hGH de acción prolongada de la presente invención, se desvelan referencias tales como la Patente Coreana N.º 0725315 en la presente invención como una referencia citada. Los expertos en la técnica pueden producir conjugados de hGH de acción prolongada de la presente invención de acuerdo con la referencia, pero no se limita estos.

30 Como se utiliza en el presente documento, la expresión 'formulación líquida de un conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado' se refiere a una formulación líquida que comprende conjugados de hormona de crecimiento humana de acción prolongada en una cantidad farmacéuticamente eficaz. En general, la cantidad farmacéuticamente eficaz de hGH corresponde con aproximadamente 1 a 3 mg en un vial de un solo uso, pero no se limita a este.

35 Además, la concentración de un conjugado de hGH de acción prolongada comprendido en la formulación líquida de la presente invención varía desde 1 a 150 mg/ml, preferentemente desde 15 a 100 mg/ml, y más preferentemente de 20 a 100 mg/ml, pero no se limita a estas.

40 La formulación líquida de un conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado de la presente invención contiene una alta concentración del conjugado de hGH por unidad de formulación, comparado con la formulación líquida existente previamente con baja concentración y por lo tanto puede llevar una forma estable de hGH en el cuerpo y almacenar una alta concentración de conjugados de hGH sin producir una precipitación proteica a diferencia de la formulación líquida existente previamente. Especialmente, incluso cuando la formulación contiene 20 a 100 mg/ml de conjugados de hGH, todavía se mantiene la estabilidad del conjugado.

La formulación líquida de un conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del conjugado de hGH de acción prolongada y un estabilizante libre de albúmina.

45 Como se utiliza en el presente documento, el término 'estabilizante' se refiere a una sustancia que permite que el conjugado de hGH de acción prolongada se almacene establemente. El estabilizador comprende un tampón, un tensoactivo no iónico, un alcohol azúcar y cloruro sódico como agente isotónico. Con respecto a las proteínas tipo conjugados de hGH de acción prolongada, la estabilidad del almacenamiento es importante para asegurar la precisión de la dosis y la supresión de la formación de antígenos potenciales contra el conjugado de hGH de acción
50 prolongada.

Como se utiliza en el presente documento, el término 'tampón' se refiere a una solución que está comprendida en el estabilizante de la presente invención y actúa para mantener estable el nivel de pH de la formulación líquida evitando un cambio brusco del pH para mantener la actividad del conjugado de hGH de acción prolongada estable. El tampón puede incluir una sal alcalina (sodio, potasio, fosfato, o sales monobásicas o sales dibásicas de los mismos), citrato sódico/ácido cítrico, acetato sódico/ácido acético, así como cualquier otro tampón de pH farmacéuticamente aceptable que se conoce en la técnica, y una combinación de los mismos. Para los objetivos de la presente invención, el tampón es preferentemente un tampón de acetato, pero no se limita a este. La

concentración de bases de acetato que constituyen el tampón de acetato sódico está preferentemente en el intervalo de 5 a 100 mM y más preferentemente en un intervalo de 10 a 50 mM, pero no se limita a esto. Preferentemente, el pH del tampón está en el intervalo de 4,0 a 7,0, más preferentemente en el intervalo de 5,0 a 6,0, y más preferentemente en el intervalo de 5,2 a 6,0. En un ejemplo de la presente invención, se confirmó que el tampón de acetato sódico con un pH de 5,6 es adecuado para el mantenimiento de la estabilidad de conjugados de hGH de acción prolongada que tienen distintas concentraciones (Tabla 5).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión 'azúcar alcohol' se refiere a un carbohidrato hidrogenado que está comprendido en la formulación líquida de la presente invención y actúa para mejorar la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada. La concentración de alcohol azúcar en la presente invención está preferentemente en un intervalo de 1 al 10 % (p/v) de un volumen total de la formulación, y más preferentemente en un intervalo del 5 a 10 % (p/v), pero no se limita a estos. El alcohol azúcar utilizado en la presente invención puede ser uno o más alcoholes azúcares seleccionados de entre el grupo que consiste en manitol y sorbitol, preferentemente manitol, pero no se limita a estos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión 'agente isotónico' se refiere a un agente que mantiene una presión osmótica apropiada cuando se inyecta una solución altamente concentrada de conjugado de hGH de acción prolongada en el cuerpo. El agente isotónico puede tener un efecto de estabilizar adicionalmente el conjugado de hGH de acción prolongada en solución. Un ejemplo del agente isotónico es una sal inorgánica hidrosoluble y preferentemente cloruro sódico. La concentración de cloruro sódico utilizado en la presente invención está preferentemente en un intervalo de 5 a 200 mM, pero no se limita a este. También dependiendo del tipo y cantidad de las sustancias comprendidas en la formulación, la cantidad de agente isotónico incluido se puede ajustar de manera que la formulación líquida que comprende todos los ingredientes sea isotónica.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión 'tensoactivo no iónico' se refiere a una sustancia que reduce la tensión superficial de la solución proteica para evitar la absorción o agregación de proteínas en una superficie hidrófoba. Ejemplos preferibles del tensoactivo que se puede utilizar en la presente invención incluye tensoactivos no iónicos de tipo polisorbato y tipo poloxámero y una combinación de los mismos, con preferencia por un tensoactivo no iónico tipo polisorbato. Ejemplos de los tensoactivos no iónicos tipo polisorbato son polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80, y entre ellos se prefiere el polisorbato 80, pero no se limita a este.

Entre tanto, no es apropiado añadir el tensoactivo no iónico a una alta concentración a la formulación líquida, ya que una alta concentración de tensoactivos no iónicos produce efectos de interferencia cuando se analiza la proteína para determinar la concentración proteica o estabilidad mediante procedimientos analíticos tales como un procedimiento espectrométrico UV o enfoque isoeléctrico (IEF) y esto hace difícil determinar la estabilidad proteica con precisión. Por lo tanto, la formulación líquida de la presente invención puede comprender el tensoactivo no iónico preferentemente a una concentración del 0,1 % (p/v) o menos, más preferentemente en un intervalo de un 0,001 a 0,1 % (p/v), e incluso más preferentemente en un intervalo de un 0,001 a 0,05 % (p/v), pero no se limita a estos. En un ejemplo de la presente invención, se confirmó que cuando la concentración de polisorbato 80 era de un 0,2 % (p/v) en un estabilizante que comprende un tampón de acetato, alcohol azúcar, cloruro sódico como agente isotónico, y polisorbato 80, induce la precipitación de un conjugado de hGH de acción prolongada después de 2 semanas (Tabla 8).

El estabilizante de la presente invención no contiene albúmina.

Como una seroalbúmina humana que se puede utilizar como estabilizador proteico se produce a partir de suero humano, existe un riesgo de que se contamine con virus patógeno derivado del ser humano. Además, la gelatina o la seroalbúmina bovina puede producir enfermedades o puede inducir una respuesta alérgica en algunos pacientes. El estabilizante libre de albúmina de la presente invención no contiene proteínas heterólogas tales como seroalbúminas derivadas del ser humano o animales ni gelatina purificada, y por lo tanto no tiene riesgo de infección vírica.

Preferentemente, el estabilizador de la presente invención puede comprender adicionalmente azúcares, alcoholes polihídricos o aminoácidos neutros.

Ejemplos preferidos de los azúcares y azúcares en alcoholes polihídricos que se puede incluir adicionalmente en la formulación para aumentar la estabilidad de almacenamiento del conjugado de hGH de acción prolongada son monosacáridos tales como manosa, glucosa, fucosa y xilosa, y polisacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa y dextrano. Ejemplos preferidos de polialcoholes incluyen el propilenglicol, polietilenglicol de bajo peso molecular, glicerol, propilenglicol de bajo peso molecular, y una combinación de los mismos.

Además, la formulación líquida de la presente invención puede comprender adicionalmente otros ingredientes o materiales que se conocen en la técnica selectivamente además del tampón descrito anteriormente, agente isotónico, alcoholes azúcares, y tensoactivos no iónicos, a menos de que disminuyan los efectos de la presente invención.

La formulación líquida de la presente invención comprende adicionalmente un conservante.

Como se utiliza en el presente documento, 'conservante' se refiere a una sustancia que reduce sustancialmente la contaminación bacteriana de la formulación. Especialmente, está comprendido en la formulación para facilitar la producción de la formulación para dosificación múltiple. Ejemplos de conservantes incluyen el cloruro de octadecildimetil-bencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (mezcla de cloruro de alquilbencildimetilamonio que tiene una cadena alquilo larga), y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como el alcohol fenólico, alcohol butílico, y alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metilparabeno o propilparabeno; catecol; resorcinol, ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol, pero no se limitan a estos. El conservante en la formulación líquida de la presente invención es preferentemente el alcohol bencílico o el m-cresol, pero no se limita a estos. La concentración del conservante está preferentemente en un intervalo de 1 a 10 mg/ml.

En un ejemplo, de la presente invención, la estabilidad de la región Fc de inmunoglobulina se examinó a diferentes pH y tampones. En el caso del pH, la región Fc de inmunoglobulina era estable a un pH de 5,6 a 6,0, y a pH 5,6 la estabilidad era incluso mayor (Ejemplo 2 y Tabla 1). Entre los tampones de citrato sódico, acetato sódico, y de histidina, la estabilidad era mayor en tampón de acetato sódico (Ejemplo 3 y Tabla 2). Basándose en estos resultados, se preparó la composición líquida que comprendía un conjugado de hGH de acción prolongada con una alta concentración de 20 mg/ml o más, tampón, cloruro sódico como agente isotónico, manitol como alcohol, y polisorbato 80 como tensioactivo. Cuando se utilizaba el acetato sódico como tampón, el conjugado no precipitaba incluso después de 2 semanas. También, en comparación con un grupo de control, la estabilidad del conjugado era mayor que el grupo de control (Ejemplo 4). Además, se examinó el efecto de concentración de alcoholes azúcares y tensioactivos comprendida en la formulación líquida de un conjugado de hGH de acción prolongada. Entonces se determinó que el conjugado era estable en un 5 % a 10 % de manitol, y no precipitaba en un 0,2 % (p/v) o menor concentración de polisorbato 80 (Ejemplo 5). También se examinó si la adición de conservante en la formulación líquida de la presente invención tenía un efecto sobre la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada. Los resultados demuestran que la estabilidad del conjugado era similar a un grupo de control incluso cuando se añadía un conservante tal como el alcohol bencílico o el cresol. Por lo tanto, se confirmó que la presente formulación líquida puede comprender adicionalmente un conservante si es necesaria una dosificación repetida (Ejemplo 6).

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de una formulación líquida de un conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada altamente concentrado. El procedimiento de la presente invención puede preparar una formulación líquida estable de un conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado, que comprende un conjugado de hGH de acción prolongada, y un estabilizante libre de albúmina, comprendiendo dicho estabilizante el tampón, tensioactivo no iónico, alcohol azúcar y cloruro sódico como agente isotónico.

El conjugado de hGH de acción prolongada, la formulación líquida, el tampón, alcohol azúcar, agente isotónico y tensioactivo no iónico son los mismos que se han descrito anteriormente.

El procedimiento para la preparación de la formulación líquida de un conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado puede comprender la etapa de mezclar el conjugado de hGH de acción prolongada con un estabilizante que comprende un tampón, un tensioactivo no iónico, un alcohol azúcar y cloruro sódico como agente isotónico. Más específicamente, el procedimiento puede comprender la etapa de (a) producir un conjugado de hGH de acción prolongada o preparar el conjugado de hGH de acción prolongada producido; y (b) mezclar el conjugado de hGH de acción prolongada preparado en la etapa (a) con un estabilizante que comprende un tampón, un tensioactivo no iónico, un alcohol azúcar y cloruro sódico como agente isotónico, pero no se limita a esto.

Además, mientras se mezcla el conjugado de hGH de acción prolongada con el estabilizante en la etapa (b) del procedimiento, se puede añadir adicionalmente un conservante, pero no se limita a esto.

Como la formulación líquida preparada por el procedimiento de la presente invención comprende un conservante, también se puede utilizar para dosificación múltiple.

De acuerdo con los ejemplos de la presente invención, un estabilizante que comprende un tampón de acetato sódico, cloruro sódico como agente isotónico, manitol como alcohol azúcar, y polisorbato 80 como tensioactivo no produce precipitación del conjugado incluso cuando se añade una alta concentración del conjugado de hGH de acción prolongada manteniendo su estabilidad (Ejemplos 1 a 5). Es decir, el conjugado de hGH de acción prolongada a una concentración alta de 20,0 mg/ml o más puede ser estable en la formulación líquida de la presente invención sin presentar precipitación proteica. También incluso cuando se añade alcohol bencílico o m-cresol como conservante a la formulación líquida, se mantiene la estabilidad. Por lo tanto, se confirmó que, si es necesaria una dosificación repetida, el conservante se puede añadir adicionalmente la formulación (Ejemplo 6 y Figura 2).

Modo de la invención

De aquí en adelante, la presente invención se describe con más detalle en referencia a Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son solo con fines ilustrativos, y la invención no pretende limitarse por estos Ejemplos.

Ejemplo comparativo 1: Preparación del conjugado de hGH de acción prolongada

Se conjugó el ALD-PEG-ALD, que es un polietilenglicol con un peso molecular (PM) de aproximadamente 3,4 kDa que tiene un grupo aldehído en ambos extremos, con hGH (PM 22 kDa), y entonces se unieron al extremo N de una región Fc aglicosilada derivada de IgG4 humana (PM 50 kDa). Mediante esto, se preparó y purificó el producto final conjugado hGH-PEG-Fc que es un conjugado de hGH de acción prolongada representativo de la presente invención.

5

Ejemplo comparativo 2: Análisis de la estabilidad de la región Fc de inmunoglobulina a diferentes pH

Se evaluó la estabilidad del polipéptido hGH y la región de Fc de inmunoglobulina que constituyen el conjugado de hGH de acción prolongada en diferentes condiciones. La estabilidad de la región Fc se comparó con diferentes pH en una formulación líquida que comprende un tampón, cloruro sódico, manitol, y polisorbato 80.

10 Se utilizó cada una de las composiciones de la Tabla 1 como tampón para la región Fc de inmunoglobulina, que entonces se almacenaron en el tampón al 40 °C durante 4 semanas, y se analizó la estabilidad de la inmunoglobulina utilizando una cromatografía de intercambio iónico (IE-HPLC). En la tabla 2, IE-HPLC (%) indica la pureza residual de la región Fc de inmunoglobulina en comparación con la pureza inicial, representada por (Área %/Área de inicio) en %.

15 Tabla 1

[Tabla 1]

	Concentración proteica	Tampón	Agente isotónico	Alcohol azúcar	Tensioactivo
n° 1	19,5 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 4,8)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 2	19,5 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,0)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 3	19,5 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,2)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 4	19,5 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,4)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 5	19,5 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 6	19,5 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,8)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 7	19,5 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 6,0)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80

Tabla 2

[Tabla 2]

	IE-HPLC (%)				
	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
n° 1	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
n° 2	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
n° 3	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
n° 4	100,0	89,8	81,8	71,4	N/D

20

(continuación)

	IE-HPLC (%)				
	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
n° 5	100,0	91,3	83,3	77,1	67,9
n° 6	100,0	91,2	83,1	76,3	66,8
n° 7	100,0	91,2	82,6	75,5	65,6
*N/D: datos no disponibles debido a precipitación por agregación					

5 Como se muestra en la Tabla 2, la IE-HPLC (%) era del 67,9 % a un pH de 5,6 (n° 5) después de 4 semanas, presentando la estabilidad más alta de la región Fc de inmunoglobulina. También, a un pH 4,8 a 5,2 (n° 1 a n° 3), la precipitación proteica estaba inducida desde el inicio, por lo tanto, no se pudo analizar su estabilidad. Y a un pH de 5,4 (n° 4), la precipitación se producía después de 3 semanas.

Ejemplo comparativo 3: Análisis de la estabilidad de la inmunoglobulina en relación al tampón

10 Basándose en formulaciones disponibles en el mercado de hGH, se comparó la estabilidad de la región Fc de inmunoglobulina en diferentes tampones, incluyendo de acetato, citrato y de histidina que se utilizan comúnmente como tampones.

Cada una de las composiciones de la Tabla 3 se utilizó como tampón para la región Fc de inmunoglobulina que se almacenaron entonces durante 3 semanas a 40 °C, y se analizó la estabilidad de la región Fc de inmunoglobulina utilizando una cromatografía de intercambio iónico. En la Tabla 4, IE-HPLC (%) indica la pureza residual de la región Fc de inmunoglobulina en comparación con la pureza inicial, representada por (Área %/Área de inicio) en %.

15 Tabla 3

[Tabla 3]

	Concentración proteica	Tampón	Agente isotónico	Alcohol azúcar	Tensioactivo
n° 1	19,5 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 2	19,5 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 3	19,5 mg/ml	20 mM de Histidina (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80

Tabla 4

[Tabla 4]

	IE-HPLC (%)			
	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas
n° 1	100,0	87,3	76,2	67,8
n° 2	100,0	88,9	77,6	68,2
n° 3	100,0	86,7	74,6	63,3

20 Como se muestra en la Tabla 4, cuando se utilizó el acetato sódico de pH 5,6 (n° 2) como tampón, la pureza residual de la región Fc de inmunoglobulina era del 88,9 % (1 semana), 77,6 % (2 semanas), y 68,2 % (3 semanas).

Estos resultados sugieren que cuando se utilizó el acetato sódico (n° 2) como tampón la estabilidad de la región Fc de inmunoglobulina era mayor que cuando se utilizaron el citrato sódico (n° 1) y la histidina (n° 3).

25

Ejemplo comparativo 4: Análisis de la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada en relación a la concentración proteica y el tampón

5 Utilizando los tampones examinados en el Ejemplo 3, se comparó la estabilidad de un conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado. Cada una de las composiciones de la Tabla 5 se utilizó como una formulación líquida para el conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado, que entonces se almacenó a 25 °C durante 4 semanas, y se analizó la estabilidad del conjugado utilizando una cromatografía de intercambio iónico y una cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC).

En la Tabla 6, IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) indican la pureza del conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado en el punto del análisis.

10 Tabla 5

[Tabla 5]

	Concentración proteica	Tampón	Agente isotónico	Alcohol azúcar	Tensioactivo
Control	19,5 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,2)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 1	39,0 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,2)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 2	39,0 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 3	39,0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 4	58,5 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,2)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 5	58,5 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 6	58,5 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 7	78,0 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,2)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 8	78,0 mg/ml	20 mM de Citrato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 9	78,0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80

Tabla 6

[Tabla 6]

	IE-HPLC (%)					SE-HPLC (%)				
	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Control	96,20	94,21	90,34	86,39	83,64	97,27	96,73	96,59	96,11	96,09
n° 1	96,01	94,76	90,52	88,26	85,77	97,30	97,02	96,77	96,24	95,98
n° 2	96,04	92,88	90,16	85,77	83,17	97,21	96,71	96,56	96,16	95,86
n° 3	95,99	93,91	90,90	88,75	86,62	97,27	96,73	96,77	96,29	96,09
n° 4	96,03	94,71	90,63	88,54	85,71	97,22	97,08	96,58	96,20	95,96

15

(continuación)

	IE-HPLC (%)					SE-HPLC (%)				
	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
n° 5	95,99	92,60	90,12	85,66	83,15	97,19	97,10	96,39	96,00	95,67
n° 6	96,03	94,72	90,85	88,56	86,61	97,15	96,69	96,62	96,21	96,02
n° 7	96,15	94,53	90,60	88,50	82,53	97,21	96,77	96,61	96,18	95,93
n° 8	96,14	92,57	90,11	85,56	82,81	97,20	96,74	96,40	95,95	95,64
n° 9	96,17	94,53	90,91	88,66	84,22	97,20	96,76	96,61	96,21	96,02

5 Como se muestra en la Tabla 6, cuando se utilizaron 20 mM de acetato sódico con un pH 5,6 (n° 3, n° 6, n° 9) como tampón, después de 4 semanas de almacenamiento, la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado era mayor que cuando se utilizaron 20 mM de citrato sódico de un pH 5,6 (n° 2, n° 5, n° 8).

También, con una concentración de proteína alta como de 39,0 mg/ml a 78 mg/ml, cuando se utilizaba el citrato sódico de pH 3,2 (n° 1, n° 4, n° 7) o citrato sódico de pH 5,6 (n° 2, n° 5, n° 8) como tampón, la proteína comenzaba a precipitar después de 2 semanas de almacenamiento y el nivel de precipitación aumentaba después de 3 semanas de almacenamiento.

10 Ejemplo comparativo 5: Análisis de la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado en relación con la concentración de alcohol azúcar y tensioactivo

15 Utilizando la formulación líquida examinada en el Ejemplo 4 (que comprende 20 mM de acetato sódico con un pH de 5,6, 150 mM de cloruro sódico, un 5 % (p/v) de manitol, un 0,005 % (p/v) de polisorbato 80), se examinó la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado a diferentes concentraciones de alcohol azúcar y tensioactivo. Aquí la concentración de alcohol azúcar y tensioactivo se seleccionó para que estuvieran en el conjunto del intervalo máximo permitido por la formulación disponible o sugerido por la institución de aprobación.

20 Cada una de las composiciones de la Tabla 7 se utilizó como una composición líquida para el conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado, que entonces se almacenaron a 25 °C durante 4 semanas, y se analizó la estabilidad del conjugado utilizando cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño.

En la Tabla 8, IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) indica la pureza del conjugado de hGH de acción prolongada en el momento del análisis.

Tabla 7

[Tabla 7]

	Concentración proteica	Tampón	Agente isotónico	Alcohol azúcar	Tensioactivo
Control-1	39,0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 1	39,0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	10 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 2	39,0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,2 % de Polisorbato 80
n° 3	39,0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	10 % de Manitol	0,2 % de Polisorbato 80
Control-2	78,0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80
n° 4	78,0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	10 % de Manitol	0,005 % de Polisorbato 80

25

(continuación)

	Concentración proteica	Tampón	Agente isotónico	Alcohol azúcar	Tensioactivo
n° 5	78,0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0,2 % de Polisorbato 80
n° 6	78,0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5,6)	150 mM de Cloruro sódico	10 % de Manitol	0,2 % de Polisorbato 80

Tabla 8

[Tabla 8]

	IE-HPLC (%)					SE-HPLC (%)				
	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Control-1	96,15	95,06	91,77	89,30	86,42	97,22	96,96	96,87	96,71	96,50
n° 1	96,12	95,04	91,68	89,11	86,19	97,22	96,96	96,77	96,15	96,09
n° 2	96,12	95,04	91,64	89,14	86,31	97,30	96,94	96,78	96,12	95,96
n° 3	96,12	94,88	90,47	87,36	84,10	97,19	96,96	96,69	95,96	95,82
Control-2	96,15	95,08	91,76	89,33	86,40	97,25	96,90	96,86	96,69	96,42
n° 4	96,12	95,04	91,65	89,10	86,20	97,26	96,93	96,77	96,17	96,14
n° 5	96,07	95,01	91,61	89,07	86,31	97,20	96,94	96,76	96,21	95,97
n° 6	96,10	94,95	90,45	87,31	84,10	97,18	96,95	96,62	96,04	95,84

5

Como se muestra en la Tabla 8, cuando se utilizaron 20 mM de acetato sódico con un pH 5,6 junto con manitol y polisorbato 80, la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado era mayor en el control-1 y el control-2. También, cuando la concentración de polisorbato 80 era de un 0,2 % (p/v), los grupos de ensayo n° 2, n° 3, n° 5 y n° 6 presentaban precipitación proteica con cualquier concentración después de 2 semanas.

10 **Ejemplo 6: Análisis de la estabilidad de conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado en relación con un conservante**

15 Utilizando la formulación líquida identificada en el Ejemplo 5 (que comprende 20 mM de acetato sódico con un pH de 5,6, 150 mM de cloruro sódico, un 5 % (p/v) de manitol, un 0,005 % (p/v) de polisorbato 80), se examinó la estabilidad del conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado en relación al conservante. Aquí, como conservante representativo se utilizaron alcohol bencílico y m-cresol.

Específicamente, cada una de las composiciones de la Tabla 9 se utilizó como una formulación líquida para el conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado, que se almacenaron entonces a 25 °C durante 4 semanas, y se examinó la estabilidad de la formulación utilizando una cromatografía de intercambio iónico y una cromatografía de exclusión por tamaño.

20 En la Tabla 10, IE-HPLC (%) y SE-HPLC (%) indican la pureza del conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado en el momento de la comparación temprana.

Tabla 9

[Tabla 9]

	Concentración proteica	Tampón	Agente isotónico	Alcohol azúcar	Tensioactivo	Conservante
Control	39.0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5.6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0.005 % de Polisorbato 80	-
nº 1	39.0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5.6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0.005 % de Polisorbato 80	9 mg/ml de Alcohol bencílico
nº 2	39.0 mg/ml	20 mM de Acetato sódico (pH 5.6)	150 mM de Cloruro sódico	5 % de Manitol	0.005 % de Polisorbato 80	3 mg/ml de m-cresol

Tabla 10

5

[Tabla 10]

	IE-HPLC (%)					SE-HPLC (%)				
	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	Inicio	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Control	100,00	97,16	96,09	94,04	92,03	100,00	98,97	99,20	98,94	98,79
nº 1	100,00	97,88	97,18	94,57	92,52	100,00	99,91	101,15	100,49	100,25
nº 2	100,00	98,19	95,92	93,87	92,37	100,00	100,11	100,06	100,30	99,90

Como se muestra en la Tabla 10, cuando se utilizaron 9 mg/ml de alcohol bencílico o 3 mg/ml de m-cresol como conservante, la estabilidad de la formulación era similar a la del grupo de control.

10

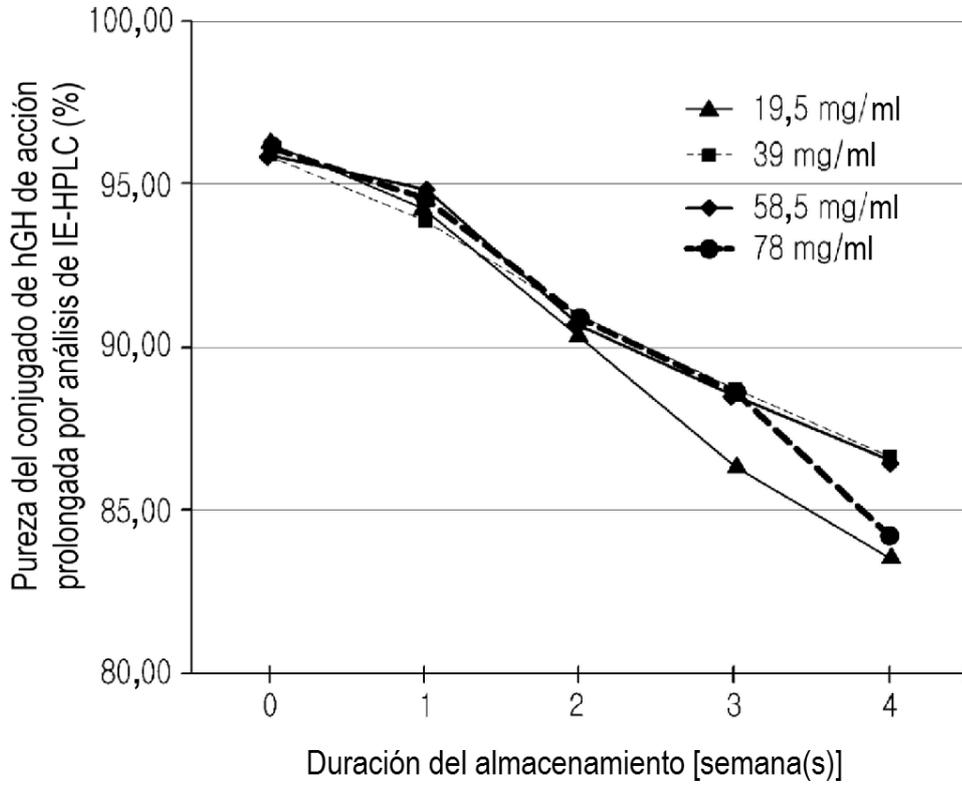
Este resultado demuestra que incluso cuando la formulación que comprende un conjugado de hGH de acción prolongada altamente concentrado de la presente invención comprende un conservante, no afecta a la estabilidad de hGH. Por lo tanto, la formulación de la presente invención que comprende un conservante se pueden aplicar para la dosificación repetida.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación líquida de un conjugado de hormona de crecimiento humana (hGH) de acción prolongada altamente concentrado, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada en la que la hormona de crecimiento humana (hGH) está unida a una región Fc de inmunoglobulina, un conservante, y un estabilizante libre de albúmina, comprendiendo dicho estabilizante un tampón, un tensioactivo no iónico, un alcohol azúcar y cloruro sódico como agente isotónico.
2. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tampón es un tampón de acetato.
3. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración del conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada varía de 20 a 100 mg/ml.
- 10 4. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el alcohol azúcar se selecciona de entre el grupo que consiste en manitol, sorbitol y una combinación de los mismos.
5. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el alcohol azúcar se utiliza a una concentración que varía del 1 al 10 % (p/v) del volumen total de la formulación.
6. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el pH del tampón varía desde 5,0 a 6,0.
- 15 7. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el cloruro sódico se utiliza a una concentración que varía desde 5 a 200 mM.
8. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tensioactivo no iónico es polisorbato 80.
9. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el tensioactivo no iónico se utiliza a una concentración que varía desde el 0,001 al 0,05 % (p/v) del volumen total de la formulación.
- 20 10. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el estabilizador comprende adicionalmente uno o más ingredientes seleccionados de entre el grupo que consiste en un azúcar, un alcohol polihídrico y un aminoácido.
11. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el conservante es un alcohol bencílico o m-cresol.
- 25 12. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el conservante se utiliza a una concentración que varía desde 1 a 10 mg/ml.
13. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la región Fc de inmunoglobulina se deriva de IgG, IgA, IgD, IgE, o IgM, preferentemente en la que cada dominio de la región Fc de inmunoglobulina es un híbrido de dominios con diferentes orígenes que se derivan de una inmunoglobulina seleccionada de entre el grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE, e IgM; o
- 30 en la que la región Fc de inmunoglobulina es un dímero o multímero compuesto por una inmunoglobulina de cadena sencilla que consiste en dominios con el mismo origen.
14. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4, opcionalmente una región Fc de IgG4 aglicosilada humana.
- 35 15. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada es un conjugado en el que la hormona de crecimiento humana está unida con la región Fc de inmunoglobulina mediante un polímero no peptídico, o utilizando una técnica de recombinación genética.
- 40 16. La formulación líquida de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el polímero no peptídico se selecciona de entre el grupo que consiste en polímeros biodegradables tales como polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter, ácido poliláctico (PLA), y ácido poliláctico-glicólico (PLGA), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico, y una combinación de los mismos, opcionalmente polietilenglicol.
- 45 17. Un procedimiento de preparación de la formulación líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende la mezcla de un conjugado de hormona de crecimiento humana de acción prolongada con un conservante y un estabilizante, comprendiendo dicho estabilizante un tampón, un alcohol azúcar, un tensioactivo no iónico y cloruro sódico como agente isotónico.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

