



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0621841-5 B1**



**(22) Data do Depósito: 06/07/2006**

**(45) Data de Concessão: 29/12/2020**

---

**(54) Título:** FORMULAÇÃO LÍQUIDA

**(51) Int.Cl.:** A61K 38/27; A61K 9/08; A61P 5/06.

**(73) Titular(es):** DAEWOONG CO., LTD..

**(72) Inventor(es):** SUN HEE KIM; YO KYUNG CHUNG; JAE YOUNG CHANG; SANG KIL LEE; MIN SUK LEE; SEUNG KOOK PARK.

**(86) Pedido PCT:** PCT KR2006002640 de 06/07/2006

**(87) Publicação PCT:** WO 2008/004717 de 10/01/2008

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 29/12/2008

**(57) Resumo:** FORMULAÇÕES LÍQUIDAS. Desamidação(25°C) É aqui revelada uma formulação líquida estável que compreende o hormônio do crescimento humano; L-lisina, L-arginina ou polietileno glicol 300; e copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol- 15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de ricino.

## “FORMULAÇÃO LÍQUIDA”

### RELATÓRIO DESCRITIVO

#### **Campo Técnico**

[001] A presente invenção relaciona-se com uma formulação líquida estável que compreende o hormônio do crescimento humano; L-lisina, L-arginina ou polietileno glicol 300; e copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 poli-oxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de rícino.

#### **Técnica Antecedente**

[002] O hormônio do crescimento humano, que é produzido na glândula humana da pituitária, é um polipeptídeo de cadeia única de 191 aminoácidos tendo um peso molecular de cerca de 22.000 dáltons. O hormônio do crescimento humano é principalmente usado para tratar o nanismo pituitário em crianças (*Endocrinol. Rev.* **4**, 155, 1983).

[003] O hormônio do crescimento humano tende a ser instável em preparações farmacêuticas. Os produtos de degradação do hormônio do crescimento, incluindo produtos desamidados ou sulfoxilados e formas de dímeros ou de polímeros, podem ser gerados em solução. Uma reação de degradação química predominante do hormônio do crescimento humano é a desamidação que acontece especialmente no resíduo de asparagina na posição 149, por hidrólise direta ou via uma succinimida cíclica intermediária para formar L-asp-hGH, L-iso-asp-hGH, D-asp-hGH e D-iso-asp-hGH. No momento, estes produtos desamidados do hormônio do crescimento humano não são acreditados terem atividade biológica tóxica ou alterada nem propriedades de ligação ao receptor, mas a estabilidade conformacional dos sulfóxidos é reduzida em comparação com o hormônio do crescimento humano nativo.

**[004]** O hormônio do crescimento humano desamidado é indesejável para uso como medicamento, porque sofre deterioração de qualidade, apesar de ter atividade biológica inalterada, e o seu conteúdo permissível é, deste modo, normalmente proporcionado pela especificação pública para a pureza. Também a formação de agregados do hormônio do crescimento, tais como dímeros ou polímeros, causa imunogenicidade indesejável, levando a um problema de segurança *in vivo*, e sólidos suspensos, levando a um problema de aparência, ocasionando, assim, o desprazer dos pacientes.

**[005]** A estabilidade da proteína está estreitamente relacionada com a água. O hormônio do crescimento humano é principalmente disponível no comércio numa formulação liofilizada para aumentar a sua estabilidade que deve ser reconstituída antes do uso. Todavia, muitos estudos têm sido conduzidos em formulações líquidas do hormônio do crescimento humano, a fim de melhorar a conveniência de médicos e pacientes. Por exemplo, a Patente US 6.448.225, relativa a Nutropin AQ da Genentech, revela uma formulação aquosa do hormônio do crescimento humano, compreendendo hormônio do crescimento humano, manitol, um tampão e um surfactante não iônico, em que o tampão do citrato era exemplificado como sendo preferível. O Pedido de Patente coreana 10-1999-0001217 proporciona uma formulação aquosa estável em que o hormônio do crescimento humano é dissolvido em uma solução tampão, que é preparada usando um tampão ligeiramente a moderadamente ácido, de preferência, um tampão de maleato, contendo cloreto de benzalcônio. O Pedido de Patente coreana 10-1998-0052483 descreve uma formulação líquida farmacologicamente estável do hormônio do crescimento humano, em que é preferida uma solução tampão c consistindo em acetato de sódio e glutamato de sódio. Também no Pedido de Patente coreana 10-1994-0702139, Novo Nordisk A/S descreve uma formulação farmacêutica que compreende um hormônio do crescimento e um aminoácido selecionado do grupo que

consiste em Asp, Ile, Val, Leu e Seu ou um derivado de histidina ou um peptídeo compreendendo pelo menos um aminoácido básico e pelo menos um aminoácido ácido e um detergente não-iônico, tal como polissorbato ou poloxâmero. Novo Nordisk A/S atualmente comercializa Norditropin SimpleXx, que contém hormônio do crescimento humano, tampão de histidina, um surfactante não iônico, cloreto de sódio e um preservante.

**[006]** Contudo, embora uma variedade de tentativas tenha sido feita para proporcionar uma formulação líquida do hormônio do crescimento, como descrito acima, existe necessidade de uma formulação líquida mais estável do hormônio do crescimento.

### **Revelação da Invenção**

#### **Problema Técnico**

**[007]** É, portanto, um objetivo da presente invenção proporcionar uma formulação líquida estável do hormônio do crescimento humano combinando um aminoácido específico, tal como L-lisina ou L-arginina ou polietileno glicol com um surfactante específico, a fim de minimizar a formação de produtos desamidados e a agregação, aumentando, assim, a estabilidade de armazenamento e a conveniência relativa a longo prazo de formulações líquidas conhecidas.

#### **Breve Descrição dos Desenhos**

**[008]** A **FIG. 1** é um gráfico que mostra a taxa residual (%) do hormônio do crescimento humano de acordo com a desamidação e agregação, quando uma formulação líquida de acordo com a presente invenção é armazenada às 25°C por três meses.

**[009]** A **FIG. 2** é um gráfico que mostra a taxa residual (%) do hormônio do crescimento humano de acordo com a desamidação e agregação, quando uma formulação líquida de acordo com a presente

invenção é armazenada a 2°C até 8°C por um ano.

### **Melhor Modo de Execução da Invenção**

**[0010]** Num aspecto, a presente invenção relaciona-se com uma formulação líquida estável que compreende hormônio do crescimento humano; L-lisina ou L-arginina; e copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de ricino.

**[0011]** O hormônio do crescimento humano, que se pretende que seja estabilizado na formulação líquida da presente invenção, pode estar ocorrendo naturalmente, ou pode ser obtido a partir de um procariota ou eucariota transformado com codificação de DNA para hormônio do crescimento humano usando uma técnica de DNA recombinante. Um método de produção do hormônio do crescimento humano usando *E. coli* ou levedura como hospedeiro do gene recombinante é descrito na literatura, por exemplo, Patente coreana 25013, Patente coreana 316347 ou Publicação de Patente coreana 10-1997-0006498. O hormônio do crescimento humano pode ser do tipo selvagem ou um derivado do mesmo.

**[0012]** A formulação líquida da presente invenção compreende L-lisina ou L-arginina como estabilizador. É preferível uma forma de sal do estabilizador, por exemplo, cloreto de L-lisina ou cloreto de L-arginina. Os estabilizadores exibiram um bom efeito de não causar nenhuma agregação depois de armazenamento durante um período predeterminado de tempo na formulação líquida do hormônio do crescimento humano em comparação com outros estabilizadores de aminoácidos convencionais. Os estabilizadores acima mencionados, conforme mostrado na Tabela 8, não sofreram nenhuma agregação depois de 14 dias e, deste modo, exibiram boa estabilidade em comparação com a histidina, que é empregada na Publicação de Patente

Internacional WO 1997/39768. Na provisão de uma formulação líquida estável do hormônio do crescimento humano, estes resultados exibem um bom efeito que não estava revelado na Patente citada acima mencionada, revelando apenas o uso de um aminoácido como estabilizador e outra literatura conhecida.

**[0013]** O copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno) (poloxâmero), macrogol-15 polioxiestearato (polietileno glicol-15 polioxiestearato) ou cremophor ELP (polietileno glicol-35 óleo de rícino), usado na formulação líquida da presente invenção, é um surfactante não iônico. Quando os presentes inventores empregaram os surfactantes acima mencionados, entre vários surfactantes não iônicos, para combiná-los com um estabilizador específico, a formulação líquida foi constatada ter estabilidade aumentada. Estes surfactantes exibiram bons efeitos com respeito à desamidação e agregação do hormônio do crescimento humano em comparação com polissorbatos convencionais, tais como Tween 20 ou Tween 80 (Tabela 5). O poloxâmero é, de preferência, o poloxâmero 188 (copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno) 188) ou poloxâmero 407 (copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno) 407) e, com maior preferência, poloxâmero 188 (copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno) 188).

**[0014]** A formulação líquida da presente invenção pode incluir ainda um aditivo conhecido na técnica, por exemplo, um tampão, um agente isotônico, um preservante ou um analgésico.

**[0015]** O tampão pode ser usado para ajustar o valor do pH da formulação líquida sem efeito sobre o hormônio do crescimento humano e é exemplificado por acetato, glutamato, lactato, malato, citrato e fosfato. O citrato de sódio ou acetato de sódio é preferível. Como é evidente a partir dos resultados do Exemplo 4, o tampão não afeta a estabilidade da formulação líquida da presente invenção. Estes

resultados são obtidos, porque a boa estabilidade da formulação líquida da presente invenção resulta da combinação de um estabilizador específico e um surfactante específico. O tampão está presente numa concentração de 5 a 100 mM e, de preferência, de 5 a 50 mM, na formulação líquida da presente invenção.

**[0016]** O agente isotônico útil na presente invenção pode incluir cloreto de sódio, manitol, sacarose, dextrose, sorbitol ou misturas dos mesmos. É preferível o D-manitol. O agente isotônico está, de preferência, presente numa concentração de 20 a 50 mg/mL na formulação líquida da presente invenção.

**[0017]** O preservante útil na presente invenção pode incluir álcool benzílico, fenol e meta-cresol. É preferível o álcool benzílico. O álcool benzílico serve como analgésico, assim como também preservante. O preservante está, de preferência, presente numa quantidade de 1 até 9 mg/mL na presente formulação líquida.

**[0018]** Num aspecto detalhado, a formulação líquida da presente invenção compreende de 2,5 a 7,5 mg/mL do hormônio do crescimento humano 0,01 a 1,0% (p/v) de L-lisina ou L-arginina por mg do hormônio do crescimento humano e 0,01 a 1,0% (p/v) de copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de rícino. Num aspecto detalhado adicional, a formulação líquida compreende de 2,5 a 5,5 mg/mL do hormônio do crescimento humano; de 0,02 a 0,5% (p/v) de L-lisina ou L-arginina por mg do hormônio do crescimento humano; e de 0,1 a 0,5% (p/v) de copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de rícino.

**[0019]** Num aspecto preferido, a formulação líquida do hormônio do crescimento humano de acordo com a presente invenção compreende de 2,5 a 5,5 mg/mL do hormônio do crescimento humano;

de 0,02 a 0,5% (p/v) de L-lisina ou L-arginina por mg do hormônio do crescimento humano; de 0,1 a 0,5% (p/v) de copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de rícino de 5 to20 mM de citrato de sódio ou acetato de sódio; de 20 a 50 mg/mL de D-manitol; e de 1 a 9 mg/mL de álcool benzílico. A formulação líquida é moderadamente ácida ou neutra e tem, de preferência, um valor de pH entre 5,8 e 7,0 e, com maior preferência, um valor de pH entre 6,0 e 6,2.

**[0020]** Noutro aspecto, a presente invenção relaciona-se com uma formulação líquida estável que compreende hormônio do crescimento humano; polietileno glicol 300; e copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de rícino.

**[0021]** O hormônio do crescimento humano e o copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de rícino contidos na formulação líquida são os mesmos descritos acima.

**[0022]** A formulação líquida da presente invenção pode incluir polietileno glicol 300 como estabilizador. O polietileno glicol é um polímero útil que é solúvel em água e dissolvido em vários solventes orgânicos. Visto que o polietileno glicol é não tóxico e rapidamente clareado do corpo, é usado para uma composição farmacêutica estável (Publicação de Patente Internacional WO 01/26692). O Pedido de Patente coreana 10-2003-0061434 revela uma formulação líquida do hormônio do crescimento humano, compreendendo polietileno glicol em vez de polissorbato, como surfactante não iônico, e não contendo anti-séptico tal como álcool benzílico ou fenol. Todavia, este Pedido descreve o uso de 0,001 a 20 mg/mL de polietileno glicol tendo um peso molecular mais alto do que 3.000 Da entre polietileno glicóis, sem usar

um surfactante. Isto está em contraste com a presente invenção, que emprega polietileno glicol tendo um peso molecular de 300 Da, isto é, polietileno glicol 300, junto com um surfactante específico, a fim de melhorar a estabilidade da formulação líquida. A presente invenção reduz a agregação através do uso em combinação de um polietileno específico glicol e um surfactante específico, como descrito acima, tornando, assim, possível o armazenamento a longo prazo de uma formulação líquida.

**[0023]** A formulação líquida acima da presente invenção pode incluir ainda um aditivo conhecido na técnica, por exemplo, um tampão, um agente isotônico, um preservante ou um analgésico. O tampão, o agente isotônico, o preservante ou o analgésico são os mesmos descritos acima.

**[0024]** Num aspecto detalhado, a formulação líquida da presente invenção compreende de 2,5 a 7,5 mg/mL do hormônio do crescimento humano; de 0,1 a 5,0% (v/v) de polietileno glicol 300 por mg do hormônio do crescimento humano; e de 0,01 a 1,0% (p/v) de copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de rícino. Num aspecto detalhado adicional, a formulação líquida compreende de 2,5 a 5,5 mg/mL do hormônio do crescimento humano; de 0,2 a 1,0% (v/v) de polietileno glicol 300 por mg do hormônio do crescimento humano; e de 0,1 a 0,5% (p/v) de copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de rícino.

**[0025]** Num aspecto preferido, a formulação líquida do hormônio do crescimento humano de acordo com a presente invenção compreende de 2,5 a 5,5 mg/mL do hormônio do crescimento humano; de 0,2 a 1,0% (v/v) de polietileno glicol 300 por mg do hormônio do crescimento humano; de 0,1 a 0,5% (p/v) de copolímero de

poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de rícino, de 5 a 20 mM de citrato de sódio ou acetato de sódio; de 20 a 50 mg/mL de D-manitol; e de 1 a 9 mg/mL de álcool benzílico. A formulação líquida é moderadamente ácida ou neutra, tem, de preferência, um valor de pH entre 5,8 e 7,0 e, com maior preferência, tem um valor de pH entre 6,0 e 6,2.

### **Modo Para a Invenção**

**[0026]** Uma melhor compreensão da presente invenção pode ser obtida através dos Exemplos seguintes que são descritos para ilustrar, mas não devem ser interpretados como o limite da presente invenção.

### **EXEMPLO 1: Preparação e análise de uma formulação líquida do hormônio do crescimento humano**

**[0027]** Uma formulação líquida de acordo com a presente invenção foi preparada como se segue.

**[0028]** 4,0 mg/mL do hormônio do crescimento humano nativo (Daewoong, Coréia), que foi provido numa solução em massa antes de ser liofilizada, foram misturados com uma solução aquoso a 10 mM de acetato de sódio (Sigma), citrato de sódio (Sigma) ou fosfato de sódio monobásico (Sigma) como tampão para ser ajustado a um pH de 6,0 até 6,2. Depois da solução ser ajustada à concentração final, foi misturada com um excipiente (D-manitol, Sigma), um surfactante {macrogol-15 polioxiestearato (Solutol HS 15, BASF), poloxâmero 188 (Lutrol F 68, BASF), poloxâmero 407 (Lutrol F 127, BASF), cremophor ELP (BASF), Tween 20 (CRILLET 1 HP, Croda) ou Tween 80 (CRILLET 4 HP, Croda)}, um estabilizador (polietileno glicol 300 (PEG 300, BASF), polietileno glicol 400 (PEG 400, BASF), PVPK-12 (Kollidon 12 PF, BASF), PVPK-15 (Kollidon 15 PF, BASF), L-lisina (L-Lisina-HCl, Sigma) ou L-arginina (L-Arginina-HCl, Sigma)) e álcool benzílicos (Daejung, Coréia) como

preservante.

**[0029]** A formulação líquida resultante foi armazenada sob condições rígidas de 40°C e 75% RH durante duas semanas. A formulação foi examinada quanto à estabilidade do hormônio do crescimento humano, de acordo com a desamidação e a polimerização ao longo do tempo. A desamidação foi determinada usando HPLC de fase reversa (RP-HPLC) e a formação de dímeros e polímeros por HPLC por exclusão de tamanho (SEC-HPLC), de acordo com o método da Farmacopéia européia (método de EP).

**EXEMPLO 2: Avaliação de efeitos de surfactantes sobre a estabilidade do hormônio do crescimento humano**

**[0030]** A fim de investigar os efeitos de surfactantes farmacologicamente aceitáveis sobre a estabilidade do hormônio do crescimento humano, foram preparadas formulações líquidas do hormônio do crescimento humano usando os componentes listados na Tabela 1 e, depois, analisados de acordo com o mesmo método do Exemplo 1.

Tabela 1

	<b>Componente Principal</b>	<b>Tampão</b>	<b>Agente Isotônico</b>	<b>Surfactante</b>	<b>Preservante</b>	<b>Solução</b>
Controle	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg		Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 1	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 202 mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 2	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Macrogol-15 poli-oxiestearato 2mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 3	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Cremophor ELP2 mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 4	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 802 mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 5	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Poloxâmero 1882 mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL

**[0031]** As formulações líquidas assim preparadas foram avaliadas quanto à desamidação e agregação do hormônio do crescimento humano, de acordo com o tipo de surfactantes, e os resultados são dados na Tabela 2, abaixo.

**[0032]** Na Tabela 2, a desamidação (%) indica a taxa residual calibrada (%) de hormônio do crescimento humano ativo não-desamidado e a agregação indica a taxa residual calibrada (%) do hormônio do crescimento humano ativo que não forma dímeros nem polímeros, de acordo com o tempo a 40°C.

Tabela 2

		<b>Controle (-)</b>	<b>DWF 1 (Tween 20)</b>	<b>DWF 2 (Macrogol- 15 poli- oxiestearato)</b>	<b>DWF 3 Cremophor ELP2</b>	<b>DWF 4 Tween 802</b>	<b>DWF 5 Poloxâmero 1882</b>
Desamidação (Somatropin %)	Day8	65,2±0,5	81,9±0,3	83,1±0,3	83,4±0,2	82,7±0,2	83,1±0,3
	Day14	45,5±0,4	69,1±0,2	68,5±0,4	69,1±0,2	68,9±0,2	69,9±0,2
Agregação (Somatropin %)	Day8	98,0±0,2	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	99,9±0,1	100,0±0,0
	Day14	80,2±0,3	99,1±0,1	99,1±0,1	99,6±0,1	99,7±0,1	99,5±0,1

**[0033]** Em comparação com o controle, as formulações preparadas usando surfactantes foram constatadas suprimir a desamidação e a agregação. Estes resultados indicam que o uso de um surfactante melhora a estabilidade de uma formulação líquida do hormônio do crescimento humano.

**EXEMPLO 3: Avaliação dos efeitos de estabilizadores sobre a estabilidade do hormônio do crescimento humano**

**[0034]** A fim de investigar a estabilidade de uma formulação líquida do hormônio do crescimento humano de acordo com estabilizadores, formulações líquidas do hormônio do crescimento humano foram preparadas usando os componentes listados em Tabela 3 e então analisou de acordo com o mesmo método que em Exemplo 1.

Tabela 3

	<b>Componente Principal</b>	<b>Tampão</b>	<b>Agente Isotônico</b>	<b>Surfactante</b>	<b>Estabilizante</b>	<b>Preservante</b>	<b>Solução</b>
Controle	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 202 mg	---	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 6	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 202 mg	PEG 3001% v/v	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 7	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 202 mg	PEG 4001% v/v	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 8	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 202 mg	PVP K-125 mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 9	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 202 mg	PVP K-175 mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 10	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 202 mg	L-Lis-H C11 mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 11	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 202 mg	L-Agn-HCl	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL

**[0035]** As formulações líquidas assim preparadas foram estimadas para desamidações e agregação, de acordo com o tipo de estabilizadores e os resultados são dados na Tabela 4, abaixo.

Tabela 4

	<b>Desamidação</b>		<b>Agregação</b>	
	<b>(somatropina %)</b>		<b>(somatropina %)</b>	
	Dia 7	Dia 14	Dia 7	Dia 14
Controle (-)	70,8 ±0,2	52,0±0,3	100,0±0,0	97,0±0,2
DMF6 (PEG 300)	83,7±0,1	70,6±0,2	100,0±0,0	99,6±0,1
DMF7 (PEG 400)	79,7±0,1	66,9 ±0,1	100,0±0,0	99,3±0,1
DMF8 (PVP K-12)	80,8 ±0,2	69,0 ±0,2	100,0±0,0	99,5±0,1
DMF9 (PVP K-17)	80,7 ±0,2	69,0 ±0,2	100,0±0,0	99,4±0,1
DMF10 (L-Lis mg)	83,3 ±0,1	70,4±0,1	100,0±0,0	100,0±0,0
DMF11 (L- AgnmgHCl)	83,5 ±0,1	70,2±0,1	100,0±0,0	100,0±0,0

**[0036]** Como mostrado na Tabela 4, entre os estabilizadores que

foram usados, PEG 300 (polietileno glicol 300) e dois aminoácidos, L-Lis mg HCl e L-Arg mg HCl, foram constatados estabilizar o hormônio do crescimento humano. Em particular, quando foram usadas a L-lisina e a L-arginina, a agregação foi suprimida num grau relativamente alto numa formulação.

**EXEMPLO 4: Avaliação dos efeitos tampão sobre a estabilidade do hormônio do crescimento humano**

**[0037]** A formulação líquida contendo PEG 300, que foi provada estabilizar o hormônio do crescimento humano numa formulação líquida no Exemplo 3, foi ainda examinada quanto à estabilidade do hormônio do crescimento humano de acordo com o tipo de tampões.

**[0038]** As formulações líquidas do hormônio do crescimento humano foram preparadas a partir dos componentes listados na Tabela 5, de acordo com o mesmo método do Exemplo 1.

Tabela 5

	<b>Componente Principal</b>	<b>Tampão</b>	<b>Agente Isotônico</b>	<b>Surfactante</b>	<b>Estabilizante</b>	<b>Preservante</b>	<b>Solução</b>
DWF 12	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 202 mg	PEG 3001% v/v	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 13	Somatropina 3,3mg	Citrato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 202 mg	PEG 3001% v/v	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 14	Somatropina 3,3mg	Fosfato de sódio 10 mM	D-manitol 50mg	Tween 202 mg	PEG 3001% v/v	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL

**[0039]** A estabilidade das formulações líquidas assim preparadas de acordo com o tipo de tampões foi determinada analisando a formação de formas desamidadas e dímeros/polímeros do hormônio do crescimento humano com o passar do tempo a 40°C. As taxas residuais do hormônio do crescimento humano ativo foram descritas na Tabela 6, abaixo.

Tabela 6

	<b>Desamidação</b> <b>(somatropina %)</b>		<b>Agregação</b> <b>(somatropina %)</b>	
	Dia 7	Dia 14	Dia 7	Dia 14
DMF12 (acetato de sódio)	83,7±0,1	70,6±0,2	100,0±0,0	99,27±0,3
DMF13 (citrato de sódio)	82,7±0,5	70,9±0,1	100,0±0,0	99,62±0,1
DMF14 (fosfato de sódio)	80,8 ±0,4	69,0±0,3	100,0±0,0	99,12±0,4

**[0040]** Os tampões foram convencionalmente descritos como sendo importantes numa formulação líquida do hormônio do crescimento humano na Patente e Pedidos acima mencionadas (Patente US 6.448.225, Pedido de Patente coreana 10-1999-0001217 e Pedido de Patente coreana 10-1998-0052483). Todavia, a formulação líquida da presente invenção, conforme mostrado na Tabela 6, não exibiu

nenhuma diferença marcada na estabilidade dependendo do tipo de tampão convencionalmente usado.

**EXEMPLO 5: Comparação da estabilidade de formulações líquidas**

**[0041]** A fim de comparar a estabilidade de formulações líquidas de acordo com a presente invenção, foram preparadas duas formulações de controle líquido (controle 1 e controle 2) usando os componentes listados na Tabela 7 abaixo e comparados com formulações líquidas do hormônio do crescimento humano (hGH) preparadas de acordo com o mesmo método do Exemplo 1.

Tabela 7

	<b>Componente Principal</b>	<b>Tampão</b>	<b>Agente Isotônico</b>	<b>Surfactante</b>	<b>Estabilizante</b>	<b>Preservante</b>	<b>Solução</b>
Controle 1	Somatropina 2,7mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol	Tween 20	---	Álcool benzílico	Solução injetável 1 mL
Controle 2	Somatropina 3,3mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol	Poloxâmero 188	Histidina	Fenol	Solução injetável 1 mL
DWF 15	Somatropina 2,5mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 1,35mg	Macrogol-15 poli-oxiestearato 2mg	PEG 3001% v/v	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 16	Somatropina 5,0mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 1,30mg	Macrogol-15 poli-oxiestearato 2mg	PEG 4001% v/v	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 17	Somatropina 2,5mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 1,38mg	Poloxâmero 188 2mg	L-Lis-H C11 mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 18	Somatropina 5,0mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 1,38mg	Poloxâmero 188 2mg	L-Lis-H C12 mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 19	Somatropina 2,5mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 1,38mg	Poloxâmero 188 2mg	L-Lis-H C11 mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL
DWF 19	Somatropina 5,0mg	Acetato de sódio 10 mM	D-manitol 1,38mg	Poloxâmero 188 2mg	L-Lis-H C12 mg	Álcool benzílico 2,5 mg	Solução injetável 1 mL

**[0042]** As formulações líquidas de hGH assim preparadas foram armazenadas por 14 dias sob condições de 40°C e 75% RH. Então, foram determinadas as taxas residuais de somatropina usando SEC-HPLC. Também, as formulações foram incubadas a 2°C até 8°C por 24 horas com agitação horizontal (20 mm de amplitude, 220 oscilações por minuto) e foram, então, examinadas quanto à agregação e aparência. Os resultados são dados na Tabela 8, abaixo.

Tabela 8

	40°C, 75% RH	Agitação durante 24 horas	
	Agregação	Agregação	Aparência
	Dia 14 (somatropina %)	Dia 14 (somatropina %)	Clara e transparente (X) Ligeiramente produzida (Δ) Túrbida (O) produção muito elevada de agregados (OO)
Controle 1	97,00±0,15	94,57±0,05	OO
Controle 2	99,11±0,05	96,26±0,07	O
DWF15	99,99±0,01	99,99±0,01	X
DWF16	98,22±0,06	97,01±0,15	O
DWF17	100,00±0,00	100,00±0,00	X
DWF18	99,98±0,01	99,97±0,02	X
DWF19	100,00±0,00	100,00±0,00	X

DWF20	100,00±0,00	99,98±0,01	X
-------	-------------	------------	---

**[0043]** Conforme mostrado na Tabela 8, foram produzidos agregados no nível mais alto no Controle 1, que não continha nenhum estabilizador e no segundo nível mais elevado no Controle 2, que foi preparado usando histidina como estabilizador. Em contraste, as formulações líquidas da presente invenção, com a exceção de DWF16, nunca produziram agregados. Estes resultados indicam que pode ser preparada uma formulação líquida estável do hormônio do crescimento humano combinando um aminoácido específico, L-lisina ou L-arginina, ou PEG 300, que serve de estabilizador, com um surfactante específico.

**[0044]** Além disso, as formulações líquidas foram examinadas quanto às taxas residuais de somatropina, quando armazenadas a 25°C por três meses e a 20°C a 80°C durante até um ano. Os resultados são dados na Tabela 9, abaixo, e Figuras 1 e 2.

Tabela 9

	25°C (3 meses)		2°C a 8°C (1 ano)	
	Desamidação (somatropina %)	Agregação (somatropina %)	Desamidação (somatropina %)	Agregação (somatropina %)
DMF15	92,34±0,20	98,24±0,08	94,56±0,12	99,78±0,02
DMF16	93,15±0,15	98,45±0,06	95,64±0,05	99,43±0,03
DMF17	95,26±0,19	100,00±0,00	98,06±0,05	100,00±0,00
DMF18	94,56±0,18	99,93±0,03	99,17±0,09	100,00±0,00

**[0045]** Conforme mostrado na Tabela 9 e nas Figuras 1 e 2, as formulações líquidas foram estáveis durante o armazenamento por um

período de pelo menos um ano.

### **Aplicabilidade Industrial**

**[0046]** Conforme descreveu anteriormente, a presente invenção empregou um estabilizador específico em combinação com um surfactante específico, a fim de superar o problema da baixa estabilidade de uma formulação líquida do hormônio do crescimento humano, suprimindo, assim, a formação de produtos desamidados do hormônio do crescimento humano e, em particular, impedindo a agregação em dímeros ou polímeros, levando a uma estabilidade notavelmente aumentada. Deste modo, a formulação líquida de acordo com a presente invenção é altamente resistente a esforços externos durante o transporte e o armazenamento.

## REIVINDICAÇÕES

**1. Formulação Líquida, caracterizada** por que compreende o hormônio do crescimento humano; L-lisina ou L-arginina; e copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de rícino.

**2. Formulação Líquida,** de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** por que a L-lisina ou L-arginina é um sal de cloreto.

**3. Formulação Líquida,** de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** por que o copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno) é o poloxâmero (copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno)) 188.

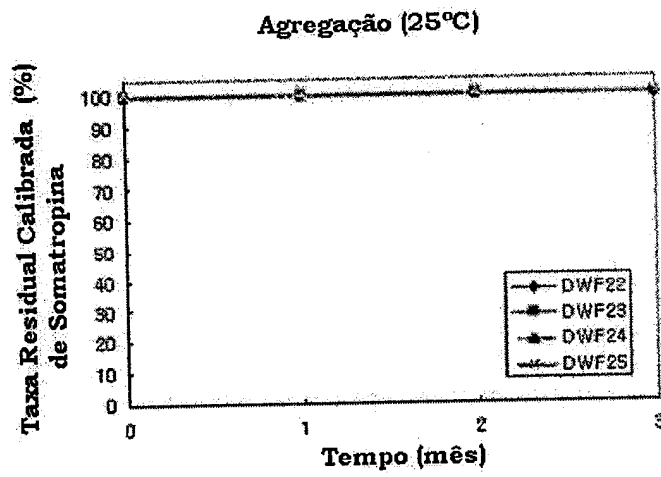
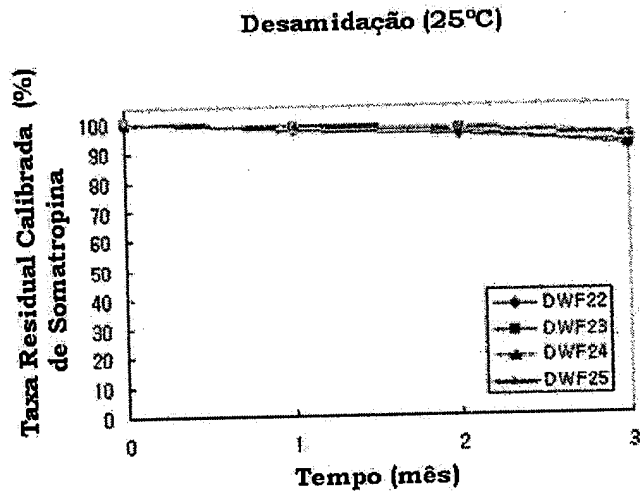
**4. Formulação Líquida,** de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** por que o hormônio do crescimento humano está presente numa quantidade situando-se de 2,5 até 5,5 mg/mL; a L-lisina ou L-arginina numa quantidade situando-se de 0,02 até 0,5% (p/v) por mg do hormônio do crescimento humano; e o copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou polietileno glicol-35 óleo de rícino numa quantidade situando-se de 0,1 até 0,5% (p/v).

**5. Formulação Líquida,** de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** por que compreende ainda pelo menos um selecionado dentre um tampão, um agente isotônico, um preservante e um analgésico.

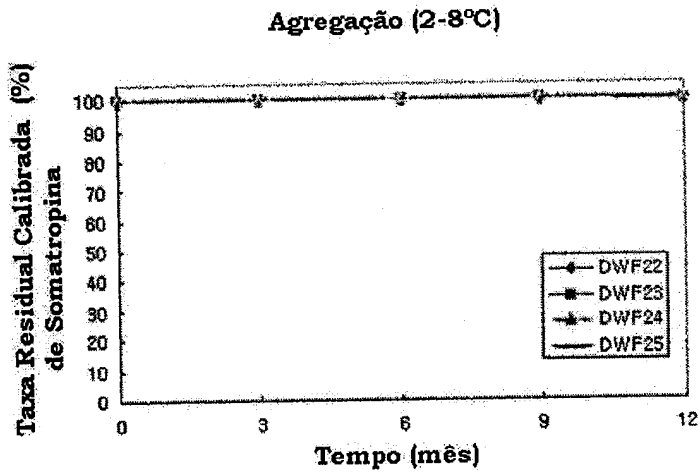
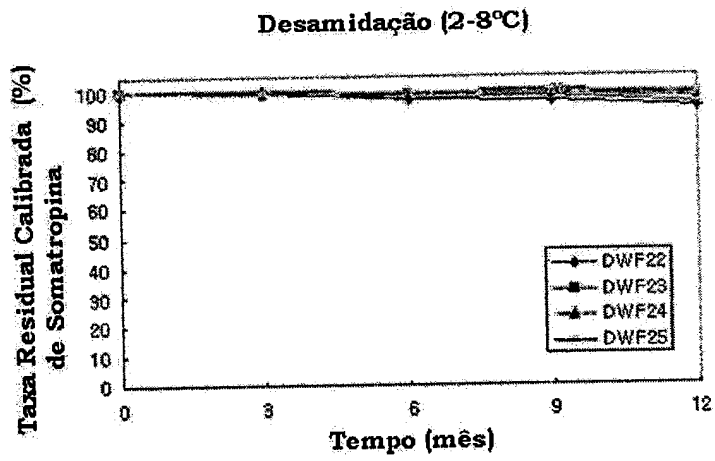
**6. Formulação Líquida,** de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizada** por que o hormônio do crescimento humano está presente numa quantidade situando-se de 2,5 até 5,5 mg/mL; a L-lisina ou L-arginina numa quantidade situando-se de 0,02 até 0,5% (p/v) por mg do hormônio do crescimento humano; o copolímero de poli(oxietileno) poli(oxipropileno), polietileno glicol-15 polioxiestearato ou

polietileno glicol-35 óleo de rícino numa quantidade situando-se de 0,1 a 0,5% (p/v); citrato de sódio ou acetato de sódio numa quantidade situando-se de 5 até 20 mm; D-manitol numa quantidade situando-se de 20 até 50 mg/mL; e álcool benzílico numa quantidade situando-se de 1 até 9 mg/mL.

30



**Figura 1**



**Figura 2**