



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 291 264**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/27 (2006.01)

A61K 47/22 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

C07K 14/61 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01128974 .1**

(86) Fecha de presentación : **16.12.1992**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1197222**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **17.04.2002**

(54) Título: **Formulación farmacéutica estabilizada comprendiendo una hormona de crecimiento e histidina.**

(30) Prioridad: **20.12.1991 DK 2046/91**
10.11.1992 DK 1364/92

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(73) Titular/es: **NOVO NORDISK A/S**
Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK

(72) Inventor/es: **Sorensen, Hans Holmegaard;**
Skriver, Lars y
Hoelgaard, Annie Rassing

(74) Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

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 farmacéutica estabilizada comprendiendo una hormona de crecimiento e histidina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica estabilizada comprendiendo un derivado de hormona de crecimiento humana.

10 **Antecedentes de la invención**

Las hormonas de crecimiento (GH) del hombre y de animales domésticos comunes son proteínas de aproximadamente 191 aminoácidos, sintetizados y segregados procedentes de la parte anterior de la glándula pituitaria. La hormona de crecimiento humana contiene 191 aminoácidos.

15 La hormona de crecimiento es una hormona clave implicada, no sólo en la regulación del crecimiento, sino también en la regulación del metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos. El efecto más importante de la hormona de crecimiento es el de promover el crecimiento.

20 Los sistemas orgánicos afectados por la hormona de crecimiento incluyen el esqueleto, tejido conjuntivo, músculos, y vísceras tales como el hígado, intestino y riñones.

Hasta el desarrollo de la tecnología recombinante y de la clonación del gen de la hormona de crecimiento que actualmente incrementan la producción, por ejemplo de la hormona de crecimiento humana (hGH) y Met-hGH a escala industrial, sólo se podía obtener la hormona de crecimiento humana mediante la extracción de las glándulas pituitarias de cadáveres humanos. Las reservas muy limitadas de hormona de crecimiento restringían el uso de esta última para la promoción del crecimiento longitudinal durante la infancia y la pubertad para el tratamiento de enanismo, aunque ésta ha sido propuesta para el tratamiento *inter alia*, de la estatura pequeña (debido a una deficiencia de la hormona de crecimiento, estatura pequeña normal y Síndrome de Turner), de la deficiencia de hormona de crecimiento en adultos, infertilidad, tratamiento de quemaduras, cicatrización de heridas, distrofia, soldadura de huesos, osteoporosis, hemorragia gástrica difusa y pseudoartrosis.

Además, se ha propuesto una hormona de crecimiento para aumentar el nivel de crecimiento en animales domésticos o para reducir la proporción de grasa en animales que deben ser sacrificados para su consumo humano.

35 Las preparaciones farmacéuticas de hormona de crecimiento tienden a ser inestables. Se generan productos de degradación como los productos deamidados o sulfoxidados y formas dímeras o polímeras - especialmente en soluciones de hormona de crecimiento.

40 Las reacciones de degradación predominantes de la hGH son 1) desamidación por hidrólisis directa o por un intermediario de succinimida cíclica para formar varias cantidades de L-asp-hGH, L-iso-asp-hGH, D-asp-hGH, y D-iso-asp-hGH (ref 1, 2), oxidación de los residuos de metionina en las posiciones 14 y 125 (ref 4-9, y 3) de división de enlaces peptídicos.

45 La desamidación se desarrolla especialmente en Asn en la posición 149.

La hGH se oxida fácilmente más bien en las posiciones 14 y 125, especialmente en una solución (4-8).

50 La oxidación de la hGH en una solución formando sulfóxidos se debe normalmente al oxígeno disuelto en la preparación. La solubilidad del oxígeno en agua destilada es de aproximadamente 200 μM (9). Como la concentración de hGH en una preparación comprendiendo 4 UI/ml es de 1,3 mg/ml correspondiendo a 60 nM de hGH, el oxígeno, en condiciones de almacenamiento normal, estará presente en un exceso de aproximadamente 3000 veces la cantidad estequiométrica para una oxidación de la hGH. No es factible tratar de resolver el problema a través de la desgasificación de tampones antes de sellar y envasar las preparaciones.

55 Actualmente no se considera que estos productos de degradación tengan una actividad biológica tóxica o alterada o propiedades de unión del receptor, pero existe una indicación de que la estabilidad de conformación de los sulfóxidos es reducida en comparación a la hGH nativa.

60 Para el desarrollo de una preparación estable, disuelta, comprendiendo la hGH, es importante conocer el nivel de formación de sulfóxidos así como los medios de control de la oxidación.

La cinética de degradación depende de la temperatura, pH y varios aditivos o adyuvantes en la formulación de la hGH.

65 Debido a la inestabilidad, la hormona de crecimiento es actualmente liofilizada y almacenada en forma liofilizada a 4°C hasta que sea reconstituida para su uso con el fin de minimizar la degradación.

Las preparaciones farmacéuticas liofilizadas comprendiendo hGH son, actualmente, reconstituidas por el paciente y almacenadas después como solución a baja temperatura, frecuentemente a aproximadamente 4°C en el frigorífico, durante el periodo de uso de hasta 14 días, durante el cual tendrá lugar alguna degradación.

Además, el proceso de reconstitución de la hormona de crecimiento liofilizada suele causar dificultades al paciente.

Por ello, actualmente se prefiere reconstituir la hormona de crecimiento lo más tarde posible antes de su uso y almacenar y transportar la preparación en un estado liofilizado. La cadena desde el fabricante hasta la farmacia es adecuada para tratar las preparaciones a una temperatura baja controlada de por ejemplo 4°C, que permite una duración de conservación larga de hasta dos años.

No obstante, el uso extendido de sistemas de pluma para la automedicación y el amplio campo de uso requieren una preparación que sea estable durante un largo periodo de tiempo suficiente con el usuario final en condiciones en las que un enfriamiento "suficiente" no siempre está disponible.

Preferiblemente, una preparación debe ser estable con el usuario final en un estado liofilizado durante aproximadamente un mes y además durante un mes en un estado reconstituido en un dispositivo de pluma durante el periodo previsto para el uso de un cartucho.

En consecuencia, existe una necesidad de obtener preparaciones más estables de la hormona de crecimiento que sean estables en un estado liofilizado a una temperatura relativamente alta durante un periodo y también durante un periodo de uso a una temperatura relativamente alta como solución. Tal estabilización es extremadamente importante cuando se desplaza la administración de la hormona de crecimiento de las clínicas hasta los hogares de los individuos que deben ser tratados y donde no se puede disponer de un almacenamiento óptimo como se ha indicado anteriormente.

Además, el cambio del modelo de administración de la hormona de crecimiento al uso de dispositivos de pluma requiere una preparación disuelta estable comprendiendo una hormona de crecimiento para facilitar la manipulación al paciente. Una preparación disuelta estable comprendiendo la hormona de crecimiento puede ser producida lista para el uso en forma de cartuchos que se disponen en el dispositivo de pluma usado por el paciente quien puede evitar así la reconstitución de la preparación, y por consiguiente, no necesitará tener una preparación liofilizada ni vehículo adecuado para la reconstitución, ni tampoco poseer la habilidad necesaria ni un equipamiento estéril para la reconstitución esterilizada de la preparación.

Por razones de seguridad también se deseará evitar la reconstitución de una preparación liofilizada precisamente antes del uso de la preparación.

Además, también será una ventaja evitar la etapa de liofilización en la producción de preparaciones de hormona de crecimiento. La liofilización es un proceso muy largo y costoso y es definido también frecuentemente como "cuello de botella" en la producción debido a la capacidad limitada del liofilizador.

Por ello existe una necesidad de reducir la velocidad de los procesos de degradación para permitir que las preparaciones de hGH disueltas sean estables durante su almacenamiento y durante un periodo de uso de hasta un mes.

Los intentos previos para estabilizar la hGH no han resultado completamente positivos con respecto a la prevención de la formación de dímeros. Los problemas asociados con la formación de dímeros están indicados por ejemplo en Becker, G.W., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9, 478 (1987).

La publicación de patente internacional N° WO 89/09614 y la publicación de patente australiana N° 30771/89 exponen una formulación farmacéutica estable conteniendo una hormona de crecimiento humana, glicina y manitol. Tal preparación muestra una estabilidad mejorada durante un tratamiento y un almacenamiento normales en un estado liofilizado así como en el periodo de uso después de la reconstitución.

La solicitud de patente europea publicada N° 303 746 expone que la hormona de crecimiento animal puede ser estabilizada con varios estabilizadores para proporcionar una formación reducida de insolubles y el mantenimiento de la actividad soluble en ambientes acuosos, dichos estabilizadores incluyendo determinados polioles, aminoácidos, polímeros de aminoácidos que poseen un grupo lateral cargado a pH fisiológico, y sales de colina. Los polioles son seleccionados del grupo compuesto por azúcares no reducidos, polialcoholes, ácidos de azúcar, pentaeritritol, lactosa, dextranos hidrosolubles y Ficoll; los aminoácidos son seleccionados del grupo compuesto por glicina, sarcosina, lisina o sales derivadas, serina, arginina o sales derivadas, betaina, N,N,-dimetil-glicina, ácido aspártico o sales de éste, ácido glutámico o sales de éste; un polímero de un aminoácido con un grupo lateral cargado a pH fisiológico puede ser seleccionado de polilisina, ácido poliaspártico, ácido poliglutámico, poliarginina, polihistidina, poliornitina y sales de éstos; y los derivados de colina son seleccionados del grupo compuesto por cloruro de colina, citrato de dihidrógeno de colina, bitratarato de colina, bicarbonato de colina, citrato de tricolina, ascorbato de colina, borato de colina, gluconato de colina, fosfato de colina, sulfato de di(colina) y mucato de dicolina.

EP 374120 expone una preparación estabilizada de hormona de crecimiento comprendiendo un excipiente de poliol tamponado comprendiendo un poliol que posee tres grupos hidroxilo y un tampón para conseguir un pH en una gama

en la que la hormona de crecimiento retiene su bioactividad durante un periodo de tiempo suficiente. La histidina es mencionada como un tampón para un poliol que posee tres grupos hidroxilo.

US 4,917,685 expone una formulación que promueve el crecimiento estabilizado comprendiendo una hormona de crecimiento y un estabilizador seleccionado entre determinados polioles, aminoácidos y derivados de colina. La formulación puede estar en forma de solución acuosa.

US 4,815,568 expone una formulación que promueve el crecimiento estabilizado comprendiendo una hormona de crecimiento y un estabilizador seleccionado entre determinados aminoácidos, polímeros de aminoácido y derivados de colina. La formulación puede estar en forma de solución acuosa.

JP-A-63115821 expone una composición en polvo conteniendo una hormona de crecimiento, un aminoácido básico (por ejemplo histidina) y/o una sal de éste. La composición está prevista para una administración nasotraqueal.

Descripción de la invención

Se ha descubierto ahora sorprendentemente que una preparación de un derivado de hormona de crecimiento humana comprendiendo la histidina como aditivo o sustancia tampón en una cantidad de histidina o derivado de ésta de 0,1 a 12 mg por mg de derivado de hormona de crecimiento muestra una estabilidad muy alta contra la desamidación, oxidación y la división de enlaces peptídicos. La estabilidad del producto permite el almacenamiento y el transporte de éstos en forma de preparación disuelta.

EP 303746 menciona la polihistidina como un estabilizador potencial para una hormona de crecimiento animal pero no existe ninguna indicación de que ésta estabilice una hormona de crecimiento animal o una hormona de crecimiento humana.

EP 374120 enseña que el hidrocloreuro de histidina puede ser usado como un tampón para tamponar un poliol que posea tres grupos hidroxilo para mejorar la estabilidad de una preparación de una hormona de crecimiento en forma de solución comprendiendo una concentración elevada de hormona de crecimiento y un poliol como estabilizador. El hidrocloreuro de histidina debe ser añadido en una cantidad de aproximadamente 3% en peso de la solución correspondiente a una concentración de -0.15 M de solución de hidrocloreuro de histidina. EP 374120 enseña también que la histidina sola no imparte la estabilidad química y física a una preparación de hormona de crecimiento.

La preparación de la invención es una preparación farmacéutica de un derivado de hormona de crecimiento humana en forma de solución acuosa tamponada del derivado de hormona de crecimiento tamponado con un tampón de histidina y que posee un pH de 5 a 8. La histidina está presente en la preparación en una cantidad de 0,1 a 12 mg de histidina por mg de derivado de hGH. Tal preparación está en una forma lista para el uso y puede ser almacenada y transportada como una solución acuosa sin ninguna degradación considerable. La L-histidina tiene una pK_A de 6.0 y por consiguiente, es adecuada como tampón en sí en el rango de pH en cuestión.

Las preparaciones que poseen un pH de 6 a 7,5 son las preferidas.

En las preparaciones farmacéuticas de la invención, la concentración de histidina es preferiblemente de 1 mM a 100 mM. Más preferiblemente, la concentración de histidina es de 2 a 20 mM.

El derivado de hormona de crecimiento en preparaciones farmacéuticas de la invención es seleccionado de: formas truncadas de hormona de crecimiento humana donde uno o más residuos aminoácidos presentes en hGH ha(n) sido suprimido(s); análogos de hGH donde uno o más residuos aminoácidos en la molécula nativa ha(n) sido sustituido(s) por otro residuo aminoácido (preferiblemente el residuo de un aminoácido de origen natural, siempre que la sustitución no tenga ningún efecto adverso, como la antigenicidad o una acción reducida); y formas N- o C- extendidas terminalmente de hGH (tales como Met-hGH, Met-Glu-Ala-Glu-hGH o Ala-Glu-hGH).

El contenido de histidina en las preparaciones de la invención es calculado usando el propio peso molar de la propia histidina.

En el presente contexto, se obtiene una "alta estabilidad" cuando la preparación es más estable que las formulaciones convencionales comprendiendo un tampón de fosfato.

Parte experimental

Los ejemplos siguientes, que se refieren a la hGH *per se*, se han incluido para ilustrar el efecto estabilizante de la histidina (His) sobre la cadena polipeptídica de hGH en solución acuosa.

ES 2 291 264 T3

Ejemplo 1

Reducción de la desamidación

El nivel de desamidación fue examinado a 37°C para preparaciones de hGH comprendiendo 4 UI y 12 UI a pH 6,5 en un tampón de His en comparación con un tampón de fosfato al mismo pH.

La preparación de hGH comprendiendo 4 UI que contiene la composición A fue preparada mediante la disolución de 13,3 mg de hGH biosintética en 10 ml de 10 mM de tampón de histidina preparado mediante la disolución de 15,5 mg de histidina en 10 ml de agua desionizada conteniendo alcohol bencílico al 0,9% y añadiendo 0,1 N de ácido clorhídrico a pH 6,5. La preparación comprendiendo 12 UI fue preparada mediante la disolución de 40 mg de hGH en los mismos componentes indicados más arriba.

La preparación de hGH comprendiendo 4 UI que contiene la composición B fue preparada mediante la disolución de 13,3 mg de hGH biosintética en 10 ml de 10 mM de fosfato disodio preparado mediante la disolución de 17,8 mg de disodio-hidrógeno-fosfato en 10 ml de agua desionizada, conteniendo alcohol bencílico al 0,9% (v/v) y añadiendo 0,1 N de ácido fosfórico a pH 6.5. La preparación comprendiendo 12 UI fue preparada mediante la disolución de 40 mg de hGH en los mismos componentes indicados más arriba.

Composición A

10 mM de His

alcohol bencílico al 0,9%

HCl a pH 6,5.

Composición B

10 mM de fosfato de disodio

0.9% de alcohol bencílico

ácido fosfórico a pH 6,5.

Las preparaciones fueron examinadas por IE-HPLC para determinar el contenido de desamido-hGH inmediatamente después de la reconstitución y después de 7 días a 37°C. Los resultados aparecen en la Tabla 1 siguiente.

TABLA 1

Desamidación	Preparación	Desamido
		%
Tampón A	4 UI/ml	1,7
Inicio	12 UI/ml	2,1
Tampón A	4 UI/ml	10,1
7 días a 37 °C	12 UI/ml	10,4
Tampón B	4 UI/ml	1,8
Inicio	12 UI/ml	2,3
Tampón B	4 UI/ml	16,9
7 días a 37°C	12 UI/ml	14,9

ES 2 291 264 T3

En las figuras citadas anteriormente, aparece que la desamidación de hGH es reducida significativamente a 37°C en tampón de histidina comparado con el tampón de fosfato.

Ejemplo 2

Reducción de la desamidación en presencia de histidina o derivados de histidina

El nivel de desamidación fue examinado a 25°C en preparaciones de hGH comprendiendo 6 UI de hGH a pH 6,5 y a pH 7,3 en 5 mM, 10 mM y 100 mM de tampón His en comparación con 8 mM de tampón de fosfato al mismo pH. Además se probaron los derivados de His-Gly, His-Ala, His-Leu, His-Lys, His-Phe, His-Ser, éster metílico de histidina, histidinol, imidazol, imidazol-4-ácido acético, e histamina.

Las preparaciones de hGH fueron preparadas mediante la disolución de 20 mg de hGH biosintética en 10 ml de tampón de histidina de resistencia deseada preparado mediante la disolución de 7,8 mg, 15,5 mg, y 155,2 mg, respectivamente, de histidina en 10 ml de agua desionizada conteniendo alcohol bencílico 0,9% (v/v) y añadiendo 0,1 N de ácido clorhídrico al pH establecido.

Las formulaciones de hGH establecidas en la siguiente Tabla 2 fueron almacenadas a 25°C y analizadas para determinar los contenidos de desamido después de 14 y 30 días por IE-HPLC. Los resultados aparecen en la Tabla 2 siguiente.

TABLA 2

Contenido de desamido hGH determinado por IE-HPLC en función de la formulación y del tiempo en una solución a 25°C

Formulación (*)	Formación de compuesto desamido a 25°C	
	14 días (')	30 días
5 mM His pH 6,5	6,5	9,1
5 mM His pH 7,3	11,0	17,4
10 mM His pH 6,5	6,8	9,7
10 mM His pH 7,3	11,3	16,6
100 mM His pH 6,5	9,8	15,2
100 mM His pH 7,3	19,3	28,8
8 mM di-Na-fosfato pH 6,5	7,8	10,8
8 mM di-Na-fosfato pH 7,3	15,2	20,3
8 mM di-Na-fosfato pH 6,5, 0,3% m-cresol	9,4	13,2
10 mM Asp, pH 6,5	21,7	nd
10 mM Glu, pH 6,5	14,8	nd
10 mM His-Gly, pH 6,2	5,6	8,1

TABLA 2 (continuación)

Formulación (*)	Formación de compuesto desamido a 25°C	
	14 días (')	30 días
10 mM His-Ala pH 6,5	6,2	8,5
10 mM His-Leu pH 6,5	8,8	12,3
10 mM His-Lys pH 6,5	8,6	12,0
10 mM His-Phe pH 6,5	7,5	11,3
10 mM His-Ser pH 6,3	22,0	nd
10 mM His-metil-éster, pH 6,5	4,6	5,2
10 mM histidinol pH 6,5	27,4	nd
10 mM imidazol pH 6,5	9,2	12,2
10 mM imidazol-4-ácido acético pH 6,5	10,3	14,2
10 mM Histamina pH 6,5	9,8	12,2

*: comprende alcohol bencílico al 0,9%, excepto la formulación N°.9. El contenido de desamido-hGH en la materia prima fue: 2,1%

En la Tabla 2 anterior, la desamidación de hGH se reduce aproximadamente un 20% por la adición de histidina con respecto al tampón de fosfato a pH 6,5 y 7,3. Además, una reducción del pH de 7,3, siendo éste el pH convencional de las preparaciones comerciales de hGH, a 6,5 produce en sí una reducción del nivel de desamidación en un 50%.

El Histidinol no parece estabilizar las preparaciones en condiciones de prueba y la adición de histidina en cantidades mayores no aumenta, sino más bien reduce el efecto deseado.

Se han obtenido resultados comparables usando análogos de histidina tales como imidazol, histamina, y imidazol-4-ácido acético así como el éster metílico de histidina que aumenta la formación de sólo un 3,1% de desamido-hGH después de 30 días a 25°C, permitiendo una duración de vida de la preparación de 3-4 meses.

La adición de Asp o Glu aumenta el nivel de desamidación con respecto al fosfato a pH 6,5.

La adición de dipéptidos del tipo His-X muestra un efecto positivo de His-Gly y His-Ala mientras que His-Ser reduce la estabilidad a la desamidación.

ES 2 291 264 T3

Los resultados anteriores muestran que el nivel de desamidación es reducido por la reducción del pH y la adición de histidina en una concentración baja, preferiblemente de aproximadamente 5 mM-10 mM. El nivel de desamidación puede ser reducido en más del 50% reduciendo el pH y substituyendo el tampón de fosfato con histidina.

El uso de m-cresol o alcohol bencílico como conservante no parece tener ninguna influencia sobre el nivel de desamidación.

La formación de separación (hidrólisis de enlaces peptídicos) es reducida por la histidina a pH 6,5 con respecto al fosfato.

Ejemplo 3

Reducción de la formación de sulfóxido

Se examinó la dependencia del pH y del tipo de tampón.

Dependencia de pH:

Formulación:

Una preparación comercial de hGH (Norditropin®; 12 UI/ml comprendiendo bicarbonato, glicina y manitol + alcohol bencílico al 0,9% fue regulada a pH 8,3, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5 y 6,0 usando 0,1 N de ácido clorhídrico, y las muestras fueron dejadas a 37°C. El análisis se efectuó mediante RP-HPLC después de 0, 7 y 14 días. Los resultados aparecen en la Tabla 3 siguiente.

TABLA 3

Formación de sulfóxido

Muestra	Temp °C	Días	Sulfóxido%
pH 8,37	-	0	1,0
pH 8,37	37	7	9,0
pH 8,04	37	7	8,7
pH 7,52	37	7	8,3
pH 7,01	37	7	7,7
pH 6,52	37	7	6,5
pH 6,02	37	7	4,8
pH 8,37	37	14	14,9
pH 8,04	37	14	14,5
pH 7,52	37	14	14,0
pH 7,01	37	14	12,9
pH 6,52	37	14	11,1
pH 6,02	37	14	7,7

Como se podrá apreciar, la formación de sulfóxido de hGH es reducida cuando se reduce el pH de 8,4 a 6,0.

Tipo de Tampón, pH

Una preparación de B-hGH comprendiendo 12 mg/ml de agua destilada fue diluida en la proporción 1 + 10 con varios tampones en una concentración de 15 mM y se añadió un(os) aditivo(s) adicional(es) opcional(es). Las muestras fueron dejadas a 25°C, y se efectuó un análisis por RP-HPLC después de 10 y 34 días. Los resultados de la RP-HPLC y los aditivos opcionales aparecen en la Tabla 4 siguiente.

TABLA 4
Formación de sulfóxido

Tampón	pH	Aditivo	Sulfoxidado	
			10d	34d
			%	
Fosfato	7,3	-	1,9	5,5
Histidina	7,3	-	0,9	2,4
Histidina	6,9	-	0,9	2,0
Histidina	6,5	-	0,8	1,9
Histidina	7,3	18 mM Met	0,8	2,0
Histidina	7,3	18 mM Cys	2,4	2,9
Histidina	7,3	0,42mM toc.	1,1	3,0
Histidina	7,3	9% etanol	1,3	4,2
Histidina	7,3	18 mM asc.	41	nd
Histidina	7,3	0,8% NaCl	1,3	3,5
Toc.: tocoferol; asc.: ácido ascórbico.				

En comparación con un tampón de fosfato, se observa una reducción marcada de la formación de B-hGH sulfoxidada en un tampón de histidina (pH 7,3). Se observa una reducción de la formación de sulfóxido con un descenso del pH en el tampón His.

No se obtuvo ningún efecto adicional por adición de antioxidantes u otros aditivos.

Ejemplo 4

De manera análoga a la descrita en el ejemplo 1, la hormona de crecimiento humana biosintética fue formulada en una concentración de 6 UI/ml en alcohol bencílico al 0,9% a pH 6,5 en distintas concentraciones de histidina, 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50, o 100 mM.

Las muestras fueron almacenadas 7 días a 37°C y analizadas para determinar los contenidos de formas desamidas, oxidadas y se obtuvieron dímeros y polímeros de la misma manera que el modo descrito anteriormente. Los resultados aparecen en la Tabla 5 siguiente donde los contenidos de desamido-hGH, dímeros y polímeros, y las formas oxidadas son determinadas por IE-HPLC, GP-HPLC y RP-HPLC y los contenidos de las formas divididas de hGH son medidas por IE-HPLC.

La cantidad de dímero es baja cuando la concentración es de 1 mM de histidina o superior, para la formación de desamido, las concentraciones de compuestos de histidina de hasta 30 mM proporcionan resultados aceptables, y para una formación de formas oxidadas se prefieren concentraciones de histidina inferiores a 20 mM. Se determina un resultado global óptimo para una concentración de histidina de 5 mM.

TABLA 5

Concentración de histidina mM	Cantidad de Desamido en %	Cantidad de dímero en %	Cantidad de polímeros en %	Cantidad de formas Oxidadas en %	Formas divididas en %	pH
0	7,7	0,7	<0,2	1,5	1,4	6,3
1	7,9	0,4	<0,2	1,5	1,2	6,4
2	8,7	0,3	<0,2	1,6	1,2	6,5
5	9,6	0,4	<0,2	1,7	n.d.	6,6
10	10,8	0,4	<0,2	1,7	n.d.	6,6
20	11,6	0,4	<0,2	2,0	n.d.	6,6
30	12,0	0,3	<0,2	2,1	n.d.	6,6
50	14,4	0,5	<0,2	3,8	n.d.	6,6
100	17,0	0,3	<0,2	2,6	n.d.	6,6
n.d. no detectable						

Referencias

1) Y.-C. I Wang and M. A. Hanson. Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers. *J. Parenteral Science and Technology* 42 (Suppl.) (1988) 53-525.

2) M. C. Manning, K. Patel, R.T. Borchardt. Stability of Protein Pharmaceuticals. *Pharmaceutical Research* 6 (11) (1989) 903-918.

3) B. A. Johnson, J. M. Shirokawa, W. S. Hancock, M. W. Spellman, L.J. Basa y D. W. Asward. *J. Biol. Chem.* 264, 1462-71 (1989).

4) L. C. Teh *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262, 785-794 (1987).

5) G. W. Becker *et al.*, *Biotech. Appl. Biochem.*, 10, 326-337 (1988).

6) R. A. Houghten *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 178, 350-355 (1977).

7) R. M. Riggin *et al.*, *Anal. Biochem.*, 167,199-209 (1987).

8) P. Gellerfors *et al.*, *Acta Paediatr. Scand* (suppl), 370, 93-100 (1990).

9) M. J. Kaufman, *Pharm. Res.*, 7 (3) 289-292 (1990).

Documentos relacionados en la descripción

Esta lista de documentos relacionados por el solicitante fue recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 8909614 A [0027]
- US 4917685 A [0030]
- AU 3077189 [0027]
- US 4815568 A [0031]
- EP 303746 A [0028] [0034]
- JP 63115821 [0032]
- EP 374120 A [0029] [0035] [0035].

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

• **BECKER**, G.W. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1987, vol. 9, 478 [0026]

5 • **Y. C. J. WANG**; **M. A. HANSON** Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers. *J. Parenteral Science and Technology*, 1988 vol. 42, 53-525 [0070]

10 • **M. C. MANNING**; **K. PATEL**; **R. T. BORCHARDT**, *Stability of Protein Pharmaceuticals Pharmaceutical Research* 1989, vol. 6 (11), 903-918 [0070]

• **B. A. JOHNSON**; **J. M. SHIROKAWA**; **W. S. HANCOCK**; **M. W. SPELLMAN**; **L. J. BASA**; **D. W. ASWARD**. *J. Biol. Chem.* 1989, vol. 264, 1462-71 [0070]

15 • **L. C. TEH** *et al. J. Biol. Chem.* 1987, vol. 262, 785-794 [0070]

• **G. W. BECKER** *et al. Biotech. Appl. Biochem.*, 1988, vol. 10, 326-337 [0070]

• **R. A. HOUGHTEN** *et al. Arch. Biochem. Biophys*, 1977, vol. 178, 350-355 [0070]

20 • **R. M. RIGGIN** *et al. Biochem.* 1987 vol. 167, 199-209 [0070]

• **P. GELLERFORS** *et al. Acta Paediatr. Scand* 1990 vol. 370, 93-100 [0070]

25 • **M. J. KAUFMAN**. *Pharm. Res*, 1990 vol. 7 (3), 289-292 [0070].

REIVINDICACIONES

5 1. Preparación farmacéutica en forma de solución acuosa tamponada de un derivado de hormona de crecimiento humana con un pH de 5 a 8, y comprendiendo:

un derivado de hormona de crecimiento humana (hGH) seleccionado entre:

10 formas truncadas de hGH donde uno o más residuos aminoácidos presentes en la hGH han sido suprimidos;

análogos de hGH donde uno o más residuos aminoácidos presentes en hGH son sustituidos por otro residuo de aminoácido; y

15 formas de hGH con extensión terminal N- o C-;

e

histidina en una cantidad de 0,1 a 12 mg de histidina por mg de derivado de hGH.

20 2. Preparación farmacéutica según la reivindicación 1, donde la histidina está presente en una concentración de 1 mM a 100 mM.

25 3. Preparación farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, donde la histidina está presente en una concentración de 2 mM a 20 mM.

4. Preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que posee un pH de 6 a 7,5.

30

35

40

45

50

55

60

65