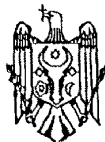




MD/EP 3419595 T2 2021.06.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3419595 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 9/00 (2006.01.01)
A61K 9/08 (2006.01.01)
A61K 47/18 (2017.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0039 (22) Data de depozit: 2017.02.24 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17707527.2, 2017.02.24 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3419595, 2019.01.02 (31) Numărul cererii prioritare: 201603280 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.02.24 (33) Țara cererii prioritare: GB	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 06/2021, 2021.06.30 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 01/2021, 2021.01.06 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 02/2019, 2019.02.28
(71) Solicitant: FERRING B.V., NL (72) Inventatori: SJOGREN Helen Ulrika, SE; HOJER-PEDERSEN Charlotte, DK (73) Titular: FERRING B.V., NL (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Formulare de gonadotropină lichidă stabilă

(57) Rezumat:

1

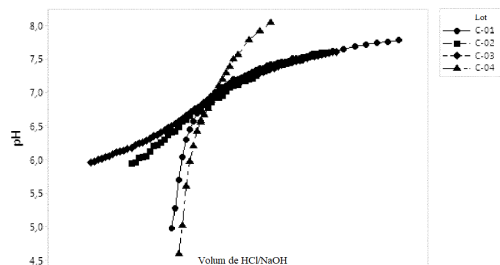
Prezenta invenție se referă în general la domeniul stabilizării formulărilor de gonadotropină, în special formulărilor lichide de gonadotropine. Stabilizarea se realizează printr-o combinație particulară de excipienți, de preferință arginină și metionină. Într-o realizare preferată, formularea nu cuprinde un tampon.

Secvențe: 4

Revendicări: 15

Figuri: 2

2



(54) Stable liquid gonadotropin formulation**(57) Abstract:**

1
The present invention pertains in general to the field of the stabilization of gonadotropin formulations, in particular liquid formulations of gonadotropins. The stabilization is achieved by a particular combination of excipients, preferably arginine and methionine. In a preferred embodiment,

2
the formulation does not comprise a buffer.

Sequences: 4

Claims: 15

Fig.: 2

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL INVENȚIEI**

- 5 Prezenta invenție se referă în general la domeniul stabilizării formulărilor de gonadotropină, în special a formulărilor lichide de gonadotropine. Stabilizarea se realizează printr-o combinație particulară de excipienți, de preferință arginină și metionină. Într-o realizare preferată, formularea nu cuprinde un tampon.

FONDUL INVENȚIEI

- 10 Gonadotropinele sunt o familie de hormoni, care sunt implicați în esență și în principal în ciclul fertilității la femei și bărbați. Gonadotropinele pot fi derivate din urină, atât în scopuri de cercetare, cât și în scopuri de tratament, cu toate acestea, mai multe gonadotropine, cum ar fi hCG, LH și FSH, pot fi, de asemenea, produse recombinant.

În special, gonadotropinele pot fi utilizate în tratamentul infertilității.

- 15 Cele patru gonadotropine principale aparțin toate aceleiași familii de glicoproteine. Acestea sunt hormonul foliculostimulant (FSH), hormonul stimulator al tiroidei (TSH), hormonul luteinizant (LH) și gonadotropina (umană) corionică (hCG). Toate aceste gonadotropine sunt heterodimere și constau dintr-o subunitate alfa și beta; subunitatea alfa este comună tuturor, adică aceeași pentru toate cele patru gonadotropine menționate mai sus, în timp ce subunitatea, respectiv
- 20 beta diferă. Acțiunea FSH este mediată de un receptor FSH distinct. Lanțurile beta ale LH și hCG împărtășesc omologie de secvență proteică de 82% și își exercită acțiunile prin același receptor LH.

- FSH este secretat în mod natural de glanda pituitară anterioară și funcționează pentru a susține dezvoltarea foliculară și ovulația. FSH cuprinde o subunitate alfa de 92 de aminoacizi, comună celorlalți hormoni glicoproteici, de ex. LH și hCG și o subunitate beta de 111 aminoacizi unică la FSH care conferă specificitatea biologică hormonului (Pierce și Parsons, 1981, Glycoprotein hormones: structure and function, Ann Rev Biochem., 50: 465-495). Subunitatea beta matură a hCG este compusă din 145 de aminoacizi. Fiecare subunitate din FSH și hCG este modificată post-tranlațional prin adăugarea de reziduuri complexe de carbohidrați. Pentru FSH, ambele subunități poartă două situsuri pentru atașarea glicanului legat de N, subunitatea alfa la aminoacizii 52 și 78 și subunitatea beta la resturile de aminoacizi 7 și 24 (Rathnam și Saxena, (1975) Primary amino acid sequence of follicle stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit, J Biol Chem. 250 (17):6735-6746; Saxena și Rathnam, (1976) Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands, J Biol Chem. 251(4): 993-1005)). FSH este astfel glicozilat la aproximativ 30% în masă (Dias și Van Roey, (2001) Structural biology of human follitropin and its receptor. Arch Med Res. 32 (6): 510-519; Fox et al. (2001) Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. Mol Endocrinol. 15(3), 379-89). Subunitatea beta a hCG conține atât N- cat și O-glicozilare (N-13, N-30, 0-121, 0-127, 0-132 și 0-138). Glicozilarea suplimentară din subunitatea beta a hCG o face mai hidrofilă decât cea a FSH. Subunitățile β oferă specificitate pentru interacțiunea receptorilor.
- 35
- 40

- Gonadotropinele derivate din urină au fost utilizate clinic de peste 40 de ani și siguranța lor este bine stabilită. Noile generații de gonadotropină urinară foarte purificată (HP), derivate comparate cu prima generație, au fost introduse de-a lungul timpului. Puritatea crescută este obținută prin adăugarea de etape de purificare suplimentare, cum ar fi schimbul de anioni și etapele de cromatografie de interacțiune hidrofobă pentru a elimina proteinele urinare fără FSH și / sau bioactivitate a LH. Puritatea semnificativ crescută a preparatelor de gonadotropină de nouă generație facilitează studii de caracterizare mai cuprinzătoare de preparate care oferă informații suplimentare despre compoziție.
- 45

- FSH urinar purificat și menotropinele menopauzale umane (hMG), ambele izolate de urina femeilor aflate în postmenopauză, au fost utilizate de mai mulți ani în tratamentul infertilității fie pentru a induce (mono) ovulația, fie pentru a stimula foliculi multipli la pacienții supuși stimulării ovariene controlate (COS) înainte de tehnologiile de reproducere asistată (ART). Două versiuni recombinante de FSH, Gonal-F® (folitropină alfa, Merck Serono) și Puregon®/Follistim® (folitropină beta, Merck) au devenit disponibile la mijlocul anilor '90. Ambele produse sunt exprimate în linii celulare de ovar de hamster chinezesc (CHO) (Howles, C.M. (1996), ingineria genetică a FSH uman (Gonal-f), Hum Reprod. Update, 2: 172-191).
- 50
- 55

Celulele CHO sunt utilizate în mod obișnuit pentru producerea proteinelor recombinante farmaceutice. Analiza structurală a identificat faptul că acidul sialic este atașat exclusiv printr-o legătură α 2,3-. Multe glicoproteine umane conțin un amestec de legături α 2,3- și α 2,6- pentru

reziduurile de acid sialic. Prin urmare, proteinele recombinante exprimate utilizand sistemul CHO vor diferi de omologii lor naturali prin tipul lor de legături terminale de acid sialic.

INFERTILITATE

În contextul actual, „infertilitatea” va fi definită ca abilitatea diminuată sau incapacitatea de a concepe și de a avea descendenți. Se spune, de asemenea, că femeile care pot rămâne însărcinate, dar care suferă avorturi repetate, sunt infertile. Infertilitatea este, de asemenea, definită în termeni specifici ca eșecul de a concepe după un an de relații regulate fără contracepție. Infertilitatea se poate datora multor cauze. Studiile au arătat că puțin mai mult de jumătate din cazurile de infertilitate sunt rezultatul afecțiunilor feminine. Celelalte cazuri sunt cauzate de tulburări ale spermei și de factori inexplicabili. În prezent există mai multe posibilități de tratare a infertilității.

Aceste posibilități sunt relații temporale, utilizarea tehnologiilor de reproducere asistată (ART), gestionarea medicală a endometriozei, inducerea ovulației (OI), fibroamele și disfuncția sexuală feminină (FSD) și intervenția chirurgicală pentru corectarea anomaliilor.

În tehnologia de reproducere asistată și OI, se utilizează medicamente pentru stimularea ovulației. Alături de FSH, care este în primul rând responsabil pentru stimularea ovariană, preparatele de gonadotropină pot conține LH și / sau hCG.

Mai multe produse medicamentoase diferite care conțin hormoni gonadotropinici derivați din urină de la femeile însărcinate sau în postmenopauză sunt utilizate în prezent în practica clinică pentru tratamentul infertilității, cum ar fi preparatele HMG (gonadotropină menopauzală umană) care conțin un raport 1: 1 de bioactivitate FSH și LH (vezi de ex. versiunea USP 35, monografie pentru menotropine), precum și preparate care conțin doar bioactivitate FSH. Începând cu 1995, au devenit disponibile produse din gonadotropine, fabricate prin tehnologia ADN-ului recombinant.

Prin urmare, este important să se furnizeze formulări stabilizate ale acestor compuși gonadotropinici, fie singuri, fie într-un amestec.

Astfel, un scop al prezentei invenții este de a furniza formulări, în special formulări lichide, a uneia sau mai multor gonadotropine, în special a unei compoziții care conține hCG, opțional într-o combinație cu FSH, care sunt stabile. Un alt obiectiv al prezentei invenții este de a furniza o metodă pentru stabilizarea unor astfel de formulări. Un alt obiect este să se asigure o astfel de formulare care este stabilă timp de 12 luni, de preferință timp de 24 de luni, chiar mai preferabil timp de 24 de luni în condiții de depozitare plus 1 lună „în uz”, adică la temperatura camerei.

SUMARUL INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la formulări stabile de gonadotropină lichidă. Într-o realizare preferată, aceste formulări cuprind hCG. Într-o variantă preferată, această formulare cuprinde atât FSH, cât și hCG. Gonadotropinele din formulările invenției sunt de preferință derivate din urină sau derivate din plasmă, dar într-o variantă alternativă pot fi produse recombinant.

În cele ce urmează, termenul „hMG” va fi utilizat în mod interschimbabil cu „gonadotropine din urină”. În principal, gonadotropinele din urină vor fi din urina umană.

Gonadotropina corionică umană (hCG) contribuie la activitatea LH (hormonul luteinizant), care este responsabil pentru indicațiile farmaceutice aprobate în prezent. Acesta este un fapt bine cunoscut și este descris ca parte a SmPC-urilor preparatelor hMG, cum ar fi produsul Menopur®, autorizat pentru aceleași indicații ca cele revendicate în prezent. Menopur® - în aceste SmPC - cuprinde activitatea FSH și LH, dar confirmă în plus că hCG este responsabil pentru cel puțin o parte a activității LH. Astfel, orice referire la hCG în contextul prezentei invenții cuprinde formulări care cuprind o activitate a LH care poate fi atribuită la hCG.

Exemplele de realizare preferate includ următoarele:

1. O formulare farmaceutică lichidă de gonadotropină, cuprinzând o gonadotropină, arginină într-o cantitate de la 50 la 160 mM și metionină într-o cantitate de la 0,05 la 1,5 mg / ml, în care formularea nu conține un tampon suplimentar și în care pH-ul formulării este cuprins între 6,0 și 7,5.
2. Formularea farmaceutică de la punctul 1, în care gonadotropina cuprinde hCG (gonadotropină corionică umană) și opțional FSH și / sau LH.
3. Formularea farmaceutică de la punctul 1 sau 2, în care gonadotropina cuprinde hMG (gonadotropină umană menopauzală).
4. Formularea farmaceutică a oricăruia dintre punctele 1 până la 3, în care gonadotropina (cum ar fi FSH, LH și / sau hCG) este de origine umană și derivată din urină.
5. Formularea farmaceutică a oricăruia dintre punctele 1 până la 3, în care gonadotropina (cum ar fi FSH, LH și / sau hCG) este recombinantă.
6. Formularea farmaceutică a oricăruia dintre articolele precedente, cuprinzând suplimentar un conservant, preferabil fenol.

7. Formularea farmaceutică a oricăruia dintre punctele precedente, cuprinzând suplimentar un agent activ de suprafață, de preferință un polisorbitat, chiar mai preferabil polisorbitat 20.
8. Formularea farmaceutică de la punctul 6 sau 7, în care conservantul, de preferință fenolul, este prezent într-o cantitate de 4 - 6 mg / ml, de preferință într-o cantitate de 5 mg / ml.
- 5 9. Formularea farmaceutică de la punctul 7 sau 8, în care agentul activ de suprafață, de preferință polisorbitatul 20, este prezent într-o cantitate de 0,001 - 0,05 mg / ml, de preferință într-o cantitate de 0,005 mg / ml.
10. Formularea farmaceutică a oricăruia dintre articolele precedente, în care arginina este preferabil L-arginină HCl.
- 10 11. Formularea farmaceutică a oricăruia dintre punctele precedente, în care hMG este prezentă într-o cantitate de 300 - 900, mai preferată 500 - 700, chiar mai preferată 600 - 650, foarte preferabil 625 UI / ml.
12. Formularea farmaceutică a oricăruia dintre articolele precedente, care constă din
- o 625 UI/ml hMG
 - 15 o 0,15 mg/ml metionină
 - o 150 mM arginină
 - o 5 mg/ml fenol
 - o 0,005 mg/ml polisorbitat 20
 - o apă pentru injecție (WFI), și
 - 20 o în care formularea are un pH de 6,8 +/- 0,3.
13. O formulare farmaceutică lichidă așa cum este descrisă în oricare dintre punctele precedente, pentru utilizare într-o metodă de tratament a infertilității.
14. Formulare farmaceutică pentru utilizare în articolul 13, în care tratamentul este un tratament de inducție a ovulației (OI), tehnici de reproducere asistată (ART) și / sau hipogonadism
- 25 hipogonadotrofic la bărbați.
15. O metodă pentru stabilizarea unei formulări farmaceutice lichide, cuprinzând hMG, care cuprinde etapa de
- o Furnizarea unei probe de urină de la o femeie umană
 - o Extragerea hMG
 - 30 o Compunand extractul menționat cu arginină și metionină, în cantități definite în oricare dintre punctele precedente,
 - o Opțional adăugând suplimentar fenol și polisorbitat în cantități definite în oricare dintre punctele precedente,
 - o Reglarea pH-ului pentru a oferi o formulare cu un pH cuprins între 6,0 și 7,5,
 - 35 o în care nu este adăugat tampon adițional.
- Așa cum s-a descris mai sus, gonadotropinele, de ex. FSH și hCG, precum și LH sunt potrivite pentru tratamentul infertilității. În această privință, a devenit clar că formulările lichide ale acestor gonadotropine pot fi instabile; acest lucru este valabil chiar și pentru acele gonadotropine care sunt destinate unei singure utilizări. Instabilitatea poate fi și mai pronunțată
- 40 dacă formulările lichide cuprind un conservant, care este de ex. prescris pentru toate formulările multidoză.
- Prezentele formulări pot fi destinate unei singure utilizări sau, respectiv, unei utilizări multiple.
- FSH formulat în prezentele formulări poate fi FSH urinar sau derivat din plasmă sau FSH recombinant (rFSH). Într-o variantă preferată, FSH este urinar sau rFSH; deosebit de preferat este FSH urinar.
- După cum s-a menționat mai sus, acum este posibil să se producă gonadotropine, cum ar fi FSH, LH sau hCG recombinant. Astfel, referirea aici la o gonadotropină în general include întotdeauna atât derivatul urinar sau derivatul plasmatic, cât și recombinantul (r) de gonadotropină,
- 50 dacă nu se specifică altfel. Astfel, de ex. referința la „FSH” cuprinde și rFSH. Secvențele de aminoacizi și producție, precum și secvențele de acizi nucleici ale FSH, hCG și LH sunt toate binecunoscute persoanei calificate în domeniu.
- Secvențele care pot fi utilizate în contextul prezentei invenții sunt după cum urmează:
- FSH, LH și subunitate alfa hCG (SECV ID NR: 1)**
- 55 (vezi și Fiddes, J.C. și Goodman, H.M. Gena care codifică subunitatea alfa comună celor patru hormoni glicoproteici umani J. Mol. Aplic. Genet. 1 (1), 3-18 (1981))
- MDYYRKYAAIFLVLSVFLHVSAPDVQDCPECTLQENPFSSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNV**
- TSESTCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS (partea subliniată este peptida lider) (116)**
- Subunitate beta FSH (ID SECV NR.: 2)**

(vezi și Saxena, B.B. și Rathnam, P. Secvența de aminoacizi a subunității beta a hormonului foliculostimulant din glandele pituitare umane J. Biol. Chem. 251 (4), 993-1005 (1976))

MKTLOFFFLFCCWKAICCNSELNITIAIEKEECRFCSINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKELVYETVR
VPGCAHHADSLYTPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEMKE (partea subliniată este peptida lider) (129)

5 **Subunitate alfa hCG (SECV ID NR: 3)**

(vezi și Fiddes, JC, Goodman HM. ADNc pentru subunitatea beta a gonadotropinei corionice umane sugerează evoluția unei gene prin recitare în regiunea 3'-netradusă Natura. 14Aug 1980 ; 286(5774):684-7)

MEMFQGLLLLLLLSMGGTWSKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT MTRVLQGVLP
ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV SYAVALSCQC ALCRRSTTDC GGPKDHLTC DDPFQDSSS
SKAPPSLPS PSRLPGSDT PILPQ (partea subliniată este peptida lider) (165)

10 **Subunitate beta LH (SECV ID NR: 4)**

(vezi și Sairam, M.R. și Li, C.H. Human pituitary lutropin. Isolation, properties, and the complete amino acid sequence of the beta-subunit Biochim. Biophys. Acta 412 (1), 70-81 (1975))

MEMLQGLLLLLLLSMGGAWASREPLRPWCH PINAILAVEKEGCPVCITVN
TTICAGYCPTMMRVLQAVLPLPQVVTYRDVRFESIRLP GCPRGVDPVVSFPVALSCRCGPCRRSTSDC
GGPKDHLTC DHPQLSGLLFL (partea subliniată este peptida lider) (141)

15 Intr-o variantă alternativă, rFSH sau rhCG din toate exemplele de realizare este un rFSH cu acțiune lungă sau respectiv rhCG. Astfel de ex. formulările FSH cu acțiune îndelungată pot fi obținute așa cum sunt cunoscute în general de o persoană de specialitate în domeniu, de ex. prin modificarea moleculei FSH sau prin modificarea formulării.

20 "FSH" așa cum este utilizat aici cuprinde astfel toate formele posibile derivate sau recombinante urinare ale FSH menționate mai sus, precum și toate combinațiile posibile ale formei FSH. De asemenea, este cuprinsă o formulare pentru o singură utilizare și una sau mai multe formulări suplimentare (cu aceeași sau cu o gonadotropină diferită) pentru utilizare în mai multe doze.

25 Un posibil produs poate fi o formulare care include FSH (intr-o variantă preferată incluzând și hCG și / sau opțional LH, activitatea LH etc.), toate în recipiente diferite. Activitatea LH, dacă este prezentă, poate fi originară din LH sau hCG. LH poate fi înlocuit cu o doză echivalentă de hCG și invers; o „doză echivalentă” în acest context poate fi calculată așa cum este bine cunoscut în domeniu.

30 O combinație de gonadotropină deosebit de preferată este cea a FSH și hCG, de preferință ca formulare hMG într-un singur recipient, dar opțional, de ex. în recipiente diferite, de ex. flacoane sau cartușe.

35 Combinațiile posibile, care pot fi furnizate și în recipiente diferite, includ, de asemenea: FSH urinar (u) și uhCG sau uFSH și uLH; în continuare (rhCG sau rLH sau rFSH) și (uhCG sau uLH sau rhCG sau rLH) și toate permutările posibile ale acestora. Într-o variantă foarte preferată, formularea inventivă cuprinde FSH și hCG. Într-o altă realizare la fel de preferată, formularea inventivă cuprinde hCG.

40 Formulările gonadotropinei conform prezentei invenții sunt formulări lichide. De preferință, formularea este injectabilă. Formulările pot fi furnizate ca un produs având una, două sau mai multe compoziții farmaceutice, inclusiv FSH sau FSH / hCG și / sau LH, pentru administrare separată sau împreună. Dacă se administrează separat, administrarea poate fi secvențială. Produsul poate fi furnizat în orice pachet adecvat. De exemplu, un produs poate conține mai multe seringi preumplute, fiecare incluzând FSH (o compoziție FSH), sau suplimentar hCG (o compoziție hCG) de ex. în care seringile pot fi ambalate într-un pachet blister sau alte mijloace pentru a menține sterilitatea. Un produs poate conține opțional instrucțiuni pentru utilizarea formulărilor de gonadotropină.

45 Conform unui alt aspect, formularea inventivă de gonadotropină este furnizată ca un preparat cu mai multe doze. Prezenta invenție, cu toate acestea, este în mod explicit direcționată și către formulări destinate unei singure utilizări. Prezenta invenție se referă, de asemenea, la o stabilizare a formulărilor ca parte a unui kit. Un astfel de kit va cuprinde cel puțin un recipient care conține una sau mai multe doze zilnice de gonadotropină, de ex. FSH, sau de ex. două recipiente (de exemplu, un flacon), fiecare cuprinzând o gonadotropină diferită, cum ar fi hCG, și de ex. instrucțiuni suplimentare (de ex. pentru administrare) și de ex. alte mijloace pentru injectare. Într-o variantă preferată, se utilizează un stilou de injecție pentru injecții multiple, prin care soluția de gonadotropină este umplută în cartușele respective. Ingredientele active pot fi în diferite cartușe,

dar pot fi desigur injectate simultan sau in ordine secvențială, așa cum este bine cunoscut de către specialiștii în domeniu. De asemenea, două sau mai multe ingrediente active pot fi în același cartuș.

5 Intr-o variantă foarte preferată, prezenta formulare este pentru uz parenteral, chiar mai preferată pentru injecție subcutanată.

Intr-o variantă preferată, hMG este prezent în formulare într-o cantitate de 35 - 850 UI / ml, de preferință 50 -800 UI / ml, chiar mai preferat 100 - 700 UI / ml, cel mai preferat 625 UI / ml, de obicei într-o formulare multidoză.

10 O formulare preferată în mod deosebit de excipienții pentru o formulare multidoză cuprinzând hMG ca mai sus și / sau cuprinzând hMG și / sau hCG și / sau toate celelalte gonadotropine menționate ca intrând în prezenta invenție, are următoarea compoziție:

50- 160 mM arginină HCl, preferabil 150 mM, arginină HCl

0,05 to 1,5 mg/ml, preferabil 0,15 mg/ml, L-metionină

0,001 - 0,05 mg/ml, preferabil 0,005 mg/ml, Polisorbit 20

15 4,0 până la 6,0 mg/ml, preferabil 5,0 mg/ml, fenol

pH 6,0 până 7,5, preferabil pH 6,8 +/- 0,3, (pH-ul se referă la pH-ul întregii soluții.) WFI.

Concentrațiile tipice ale ingredientului activ pentru formulări care conțin hCG recombinant și / sau FSH sunt după cum urmează, deși concentrația ingredientului activ nu are nicio influență asupra performanței prezentei invenții:

20 Pentru rFSH: 30 - 150 µg/ml

Pentru rhCG: 5 - 200 µg/ml

Excipienții preferați pentru astfel de formulări recombinante sunt aceiași ca cei descriși mai sus pentru formularea multidoză de hMG. Formulările tipice cu doză unică sunt, de asemenea, cuprinse în această invenție și ar fi aceleași ca cele descrise mai sus, cu excepția faptului că nu ar cuprinde un conservant, cum ar fi fenolul.

25 Formele de depozit injectabile pot fi realizate prin formarea de matrice microincapsulate ale gonadotropinei (și a altor agenți, dacă sunt prezenți) în polimeri biodegradabili. Formele de depozit pe bază de polimeri / sistemele cu eliberare susținută pot, în funcție de natura lor chimică, să fie de exemplu micro- sau nanoparticule, hidrogeluri, miceli, emulsii sau implanturi. În funcție de raportul dintre gonadotropină și polimer și de natura polimerului utilizat, viteza de eliberare a gonadotropinei poate fi controlată. Exemplele de polimeri biodegradabili includ sisteme de copolimeri polilactidă / poliglicolidă, polivinilpirolidonă, poli (ortoesteri), poli(anhidride), poli(etilenglicol), poliaminoacizi, polizaharide de ex. hialuronat de sodiu (NaHA) sau alte săruri ale acestuia, gelatină, chitosan etc. Toți polimerii menționați pot fi derivatizați sau modificați

30 pentru a optimiza eliberarea medicamentului proteic sau stabilitatea acestuia. Formulările injectabile Depot sunt, de asemenea, preparate prin înglobarea gonadotropinei în sisteme lipidice sau amestecuri de lipide polimerice sub formă de micle, lipozomi sau microemulsii care sunt compatibile cu țesuturile corpului.

35 Formulările injectabile pot fi sterilizate, de exemplu, prin filtrare printr-un filtru de reținere a bacteriilor și / sau prin încorporarea agenților de sterilizare. Este posibil să se formeze compoziții solide sterile care pot fi dizolvate sau dispersate în apă sterilă sau alt mediu steril injectabil chiar înainte de utilizare. Formulările injectabile pot fi furnizate în orice recipient adecvat, de ex. flacon, seringă preumplută, cartușe de injecție și altele asemenea, așa cum este descris mai sus.

45 pH-ul și concentrația exactă ale diferitelor componente ale unei formulări pentru utilizare ca compoziție farmaceutică așa cum este descris aici sunt ajustate în principal în conformitate cu practica de rutină din acest domeniu, vezi de exemplu Pharmaceutical Medicine, ediția a cincea, editat de John P. Griffin și John O'Grady. Intr-o variantă preferată, compozițiile invenției sunt furnizate ca compoziții pentru administrare parenterală. Metodele generale pentru prepararea

50 formulărilor parenterale sunt cunoscute în domeniu și sunt descrise în REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, supra, la paginile 780-820. Compozițiile parenterale pot fi furnizate sub formă de lichid sau ca un solid care va fi amestecat cu un mediu steril injectabil chiar înainte de administrare. Intr-un exemplu de realizare preferat în special, compozițiile parenterale sunt furnizate sub formă de unitate de dozare pentru ușurința administrării

55 și uniformitatea dozării.

FSH, hCG și / sau LH care pot fi formulate în conformitate cu prezenta invenție pot fi derivate prin mijloace convenționale din urină, așa cum este bine cunoscut în domeniu, sau pot fi produse recombinant. Pentru posibile metode de producție este menționat în continuare de ex. WO 2009/127826.

60 O variantă preferată a invenției este formularea descrisă în prezent care cuprinde hCG.

hCG poate fi obținut prin orice mijloace cunoscute în domeniu. hCG așa cum este utilizat aici include hCG derivat din urină și hCG recombinant. O formulare care cuprinde hCG derivat din urină este preferată în special. O formulare cu activitate LH care este - cel puțin parțial - derivată din hCG (cu alte cuvinte: hCG este molecula care este responsabilă pentru această activitate LH) este de asemenea cuprinsă. HCG derivat de la om poate fi purificat din orice sursă adecvată (de ex., urină și / sau placentă) prin orice metodă cunoscută în domeniu. Metodele de exprimare și purificare a hCG recombinant sunt bine cunoscute în domeniu.

LH poate fi obținut prin orice mijloace cunoscute în domeniu. LH, așa cum este utilizat aici, include LH derivat de la om și LH recombinant. LH derivat de la om poate fi purificat din orice sursă adecvată (de ex., urină) prin orice metodă cunoscută în domeniu. Metodele de exprimare și purificare a LH recombinant sunt cunoscute în domeniu.

Termenul "compoziție farmaceutică" este utilizat aici în mod alternativ cu "formulare farmaceutică".

Compoziția farmaceutică stabilă a prezentei invenții poate fi utilizată pentru tratamentul infertilității. „Tratamentul infertilității” în contextul acestei invenții include tratamentul infertilității prin (hiper)stimulare ovariană controlată (COS) sau metode care includ o etapă sau etapă de stimulare ovariană controlată, de exemplu inseminarea intrauterină (IUI), fertilizarea *in vitro* (FIV) sau injecție intracitoplasmatică de spermă (ICSI). Termenul include, de asemenea, inducția ovulației (OI) sau metode care includ o etapă sau etapă de inducție a ovulației. Termenul include, de asemenea, tratamentul infertilității la un subiect cu infertilitate tubară sau inexplicabilă, inclusiv tratamentul infertilității la un subiect care are endometrioza, de exemplu endometrioza în stadiul I sau stadiul II (așa cum este definit de sistemul de clasificare al Societății Americane de Medicină a Reproducerii (ASRM) pentru diferitele etape ale endometriozei, clasificarea endometriozei revizuită a Societății Americane de Medicină a Reproducerii: 1996, Fertil Steril 1997; 67, 817-821), și / sau la un subiect cu un partener cu factor de infertilitate masculină. Termenul include preferabil utilizarea în ex. tehnologii de reproducere asistată (ART), inducția ovulației (OI) sau inseminarea intrauterină (IUI). Compoziția farmaceutică poate fi utilizată, de exemplu, în indicații medicale unde se utilizează preparate cunoscute de FSH sau preparate de FSH și hCG. Într-un exemplu de realizare tipic, prezenta formulare este utilizată pentru aceleași indicații medicale ca acele indicații aprobate pentru Menopur®, în Europa, după cum urmează, într-un caz exemplar:

Tratamentul infertilității feminine și masculine:

- Femei anovulatoare: *MENOPUR poate fi utilizat pentru stimularea dezvoltării foliculilor la pacienții amenoreici. Clomiphene (sau un agent similar care induce ovulația care influențează mecanismele de reacție la steroizi) este tratamentul preferat pentru femeile cu o varietate de tulburări ale ciclului menstrual, inclusiv insuficiența fazei luteale cu cicluri anovulatorii și cu prolactină normală, precum și pacienții amenoreici cu dovezi de producție de estrogen endogen dar niveluri normale de prolactină și gonadotropină normală. Non-respondenții pot fi apoi selectați pentru terapie cu menotropină.*

- Femeile supuse superovulației în cadrul unui program de fertilizare asistată medical: *MENOPUR poate fi utilizat pentru a induce dezvoltarea foliculară multiplă la pacienții supuși unei tehnici de concepție asistată, cum ar fi fertilizarea in vitro (FIV).*

- Hipogonadismul hipogonadotrofic la bărbați: *MENOPUR poate fi administrat în asociere cu gonadotropină corionică umană (de ex. Choragon) pentru stimularea spermatogenezei.* sau indicațiile aprobate pentru Menopur® în SUA după cum urmează:
Dezvoltarea foliculilor multipli și a sarcinii la femeile ovulatorii ca parte a unui ciclu de Tehnologie de reproducere asistată (ART).

Alternativ, opțiunile de tratament cu Menopur® pot fi descrise după cum urmează:
MENOPUR este indicat pentru tratamentul infertilității în următoarele situații clinice: Anovulația, inclusiv boala ovariană polichistică (PCOD), la femeile care nu au răspuns la tratamentul cu citrat de clomifen.

Hiperstimulare ovariană controlată pentru a induce dezvoltarea de foliculi multipli pentru tehnologii de reproducere asistată (ART) (de ex., fertilizarea in vitro / transferul embrionilor (FIV / ET), transferul gamet intra-falopian (GIFT) și injecția intracitoplasmatică a spermei (ICSI)).

Stimularea dezvoltării foliculare la femeile cu hipogonadism hipogonadotrofic.

Prezenta invenție prevede, de asemenea, utilizarea formulărilor stabilizate de gonadotropină descrise aici (conform aspectelor invenției) pentru sau în fabricarea unui medicament pentru tratamentul infertilității.

Intr-o variantă preferată, prezenta formulare conform invenției este utilizată pentru inducerea ovulației, tehnici de reproducere asistată (ART) și / sau pentru hipogonadismul hipogonadotrofic la bărbați.

Compozițiile farmaceutice pot fi formulate în continuare în compoziții bine cunoscute pentru orice cale de administrare a medicamentului, de ex. oral, rectal, parenteral, transdermic (de ex., tehnologia plasure), intravenos, intramuscular, subcutanat, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (pulberi, unguente sau picături) sau sub formă de spray bucal sau nazal. O compoziție tipică cuprinde un purtător acceptabil farmaceutic, cum ar fi soluția apoasă, excipienți netoxici, inclusiv săruri și conservanți, tamponi și altele asemenea, așa cum este descris în ediția a cincisprezecea a Remington's Pharmaceutical Sciences (Matt Publishing Company, 1975), la paginile 1405-1412 și 1461 până la 87; și USP-NF, The National Formulary XIV ediția a paisprezecea (American Pharmaceutical Association, 1975), printre altele. Prezenta invenție este direcționată, în unele variante, la furnizarea specifică a unei formulări care prezintă atât o stabilitate surprinzător de ridicată, cât și alte avantaje, cum ar fi fără colorare inacceptabilă, fără turbiditate inacceptabilă, durere redusă sau lipsită de durere la injecție și o iritare redusă sau lipsită de iritație a pielii la injecție. Acest lucru a devenit posibil numai cu descoperirile prezentei invenții care arată că anumite componente permit performanța avantajoasă și stabilitatea ridicată a formulărilor lichide de gonadotropină descrise aici.

Deși formulările de gonadotropină sunt pe piață de câteva decenii acum, omul de știință al formulării este foarte conștient de faptul că formularea acestor proteine este asociată cu o serie de dificultăți. Aceste dificultăți există și variază sever pe baza multor factori, cum ar fi

- Faptul că se formulează o proteină (proteinele ca atare sunt greu de formulat în orice caz)
- Faptul că proteina este glicozilată specific (glicozilarea ar putea fi influențată de selecția specifică a fabricării și a excipienților)
- Proteinele specifice formulate (chimia formulării variază semnificativ în funcție de proteina reală: s-a demonstrat, de exemplu, că și proteinele strâns legate, cum ar fi FSH și hCG, se comportă diferit în aceeași formulare, vezi de exemplu WO 2012/013742)
- Dacă proteina a fost obținută sau nu din natură, de ex. urină sau produsă recombinant
- Dacă este nevoie de un conservant (unii conservanți își îndeplinesc obiectivul de protecție împotriva creșterii microbiene, dar afectează negativ stabilitatea formulării finale. Acest lucru este valabil pentru toți, m-crezolul, fenolul și alcoolul benzilic (cu sau fără clorură de benзалconiu), care sunt în prezent singurii conservanți autorizați pentru utilizare cu gonadotropine; în plus, conservanții pot avea un efect negativ asupra colorării, în funcție de excipienții suplimentari și de ingredientul activ cuprins în formulare)
- Agentul activ de suprafață specific utilizat (aceștia pot duce, în unele cazuri, la turbiditate, în funcție din nou de excipienții suplimentari incluși într-o respectivă formulare)
- Tamponul specific utilizat (de ex., tamponul de citrat va duce frecvent la durere și iritarea pielii la injecție)
- Excipienții specifici folosiți pentru stabilizare, care vor stabiliza diferite compoziții în moduri imprevizibile.
- În funcție de excipientul utilizat pentru stabilizare, care va stabiliza diferite compoziții în moduri imprevizibile.

Astfel, omul de știință al formulării se confruntă cu un set de probleme multiple pe de o parte și un set de o multitudine de excipienți posibili pe de altă parte, ducând la o problemă complexă pentru furnizarea unei formulări cu o bună stabilitate pe de o parte și pe de altă parte, fără colorare sau turbiditate sau durere la injecție.

Prin urmare, a fost destul de surprinzător faptul că combinația actuală de arginină și metionină, **fără adăugarea de tampon**, a rezolvat aceste probleme particulare, în domeniul pH-ului actual.

În acest sens, „fără (adăugarea de/suplimentar) tampon ” și „nu cuprinde un tampon” este utilizat sinonim în această aplicație. Această expresie înseamnă că nu este adăugat / prezent în compoziție nici un compus suplimentar care ar fi considerat a avea capacitate de tampon. Se spune că o soluție este tamponată dacă rezistă schimbărilor în activitatea unui ion la adăugarea de substanțe care se așteaptă să modifice activitatea acelui ion. Tamponanele sunt substanțe sau combinații de substanțe care conferă această rezistență unei soluții. Soluțiile tamponate sunt sisteme în care ionul este în echilibru cu substanțe capabile să îndepărteze sau să elibereze ionul. Se referă la cantitatea de material care poate fi adăugată la o soluție fără a provoca o schimbare semnificativă a activității ionilor. Este definit ca raportul dintre acid sau bază adăugată (în echivalenți gram / l) la modificarea unităților de pH. Capacitatea unei soluții tamponate este ajustată la condițiile de utilizare, de obicei prin ajustarea concentrațiilor de substanțe tampon (USP NF). Capacitatea tamponului este exprimată în mod obișnuit ca numărul de echivalenți (Eq) de

acid puternic (de ex., HCl) sau de bază (de ex., NaOH) care determină un litru de soluție în cauză să sufere o modificare a pH-ului cu o unitate (de preferință la o atmosferă și 21°C) (Skoog West și Holler, Fundamentals of Analytical Chemistry, ediția a cincea). Un HCl echivalent este egal cu un mol HCl și un NaOH echivalent este egal cu un mol NaOH. In prezenta invenție, capacitatea tamponului va fi exprimată ca număr de echivalenți (Eq) de acid puternic (de ex., HCl) sau bază (de ex., NaOH) care determină ca un litru de soluție în cauză să sufere o schimbare a pH-ului cu o unitate. Astfel, în conformitate cu prezenta invenție, formularea nu trebuie să cuprindă un tampon suplimentar, care să contribuie cu $\geq 0,5$ mEq / (litru * pH) (de preferință la 1 atm, 21°C) în intervalul de pH descris pentru prezentele formulări din invenție.

10 Metodă de determinare și calculare a capacității tamponului

Capacitatea tamponului poate fi determinată și calculată după cum urmează.

Un volum definit al soluției de testat este titrat cu acid de ex. HCl sau bază de ex. NaOH. Concentrații adecvate de acid și bază, de ex. 0,2 N trebuie utilizate pentru a realiza o titrare suficient de precisă.

15 Titrarea se realizează prin adăugarea unor mici alicote de HCl sau NaOH la soluția de testare. Pentru fiecare adăugare se documentează volumul adăugat și pH-ul corespunzător.

Volumul acumulat de acid și bază este reprezentat grafic față de pH-ul măsurat, vezi de ex. Figura 1. Se realizează o ajustare de regresie pătrată cel puțin liniară pentru zona de pH relevantă și R^2 este calculat pentru a confirma validitatea liniei fixate.

20 Capacitatea tamponului exprimată în mEq / (litru × unitate pH) este calculată prin regresie liniară.

Ecuatia 1

$$Y = ax + b \Leftrightarrow x = \frac{Y - b}{a}$$

în care:

x

25 = capacitate tampon [μL 0,2 N HCl/NaOH pentru a deplasa pH 1 pH unit]

Y-b

= 1 pH unități

a

= panta

30 și

Ecuatia 2

$$x = \frac{(Y - b) \times C}{a \times V \times 10^6}$$

In care mEq este miliechivalenți de acid sau bază este dat din concentrație de ex. 0,2 N HCl/NaOH care este egal cu 0,2 echivalenți/l HCl/NaOH care este egal cu 200 mEq/l HCl/NaOH.

x = capacitatea tamponului [mEq/litru × pH unități]

35 Y-b = 1 pH unități

C = Concentrația de acid sau bază de ex. pentru

$$\text{HCl/NaOH} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{L}} = \frac{\text{mEq}}{\text{L}} \right]$$

V = Volumul de soluție în cauză

10^6 factor de corecție de la μl la litru

40 Exemplu de calcul utilizand Ecuatia 2 și lot C-01_{domeniu pH 6,564-6,947}, din tabelul 9:

$$x = \frac{1 \times 200}{0.001507 \times 0.1 \times 1000000} = 1.32 \text{ mEq/ (litru x unitate pH)}$$

Pentru a determina dacă o componentă va contribui cu $\geq 0,5$ mEq / (litru × unitate pH) la capacitatea tamponului, capacitatea tamponului este determinată așa cum este descris mai sus pentru o soluție cu componentă și pentru aceeași soluție fără componentă. Diferența dintre capacitatea determinată a tamponului pentru cele două soluții dă contribuția componente date la capacitatea tamponului.

45 Termenii „fără (adăugarea/o adăugare) un tampon” și „nu conține un tampon” înseamnă, de asemenea, că prezenta formulare conform invenției nu cuprinde niciunul dintre următoarele tampon (care sunt tampone aprobate de FDA pentru uz parenteral în intervalul de pH 6,0 - 7,5):

50 Histidină

Fosfat

Citrat
 Trometamină (Tris)
 Acid hidroxiethylpiperazin etan sulfonic (HEPES)
 Carbonat

5 În plus, termenii înseamnă, de asemenea, că niciunul dintre tampoanele aprobate de FDA pentru uz parenteral nu este inclus, în special

Acetat
 Acid adipic
 Sulfat de amoniu
 10 Succinat
 Asparagină
 Acid aspartic
 Glutamat (acid glutamic)
 Glicină
 15 Lactat
 Lizină
 Maleat (acid maleic)
 Fumarat (acid fumaric)
 Malat
 20 Meglumină
 Propionat
 Alanină
 Fenilalanină
 Cisteină
 25 Isoleucină
 Leucină
 Prolină
 Serină
 Tartrat
 30 Treonină
 Triptofan
 Tirozină
 Valină

35 Fără adăugarea unui tampon, se presupune de obicei că pH-ul soluției finale nu poate fi păstrat cu ușurință în domeniul dorit (și va fi dificil să se atingă un pH țintă specific în timpul ajustării) (în prezenta invenție, pH-ul ar trebui să fie între 6,0 și 7,5, mai preferat între 6,5 și 7,4, de preferință lasau aproximativ 6,8), dar va fluctua sever.

Este extrem de important să se mențină pH-ul corect pentru un produs farmaceutic. pH-ul definește parametri precum stabilitatea, activitatea și durata de valabilitate. Din acest motiv, formulările farmaceutice sunt de obicei formulate cu un tampon. Este disponibilă o varietate de
 40 agenți tampon și sunt selectați pentru a fi eficienți la pH-ul dorit. Tampoane exemplare care sunt utilizate în mod regulat practic în toate formulările existente de gonadotropină sunt tampon fosfat și tampon citrat. Tamponul trebuie să furnizeze formulării un pH menținut în intervalul condițiilor la care formularea ar putea fi expusă în timpul formulării și în special în timpul depozitării
 45 acesteia. Este adesea destul de dificil să găsești un astfel de tampon adecvat, și apoi, în unele cazuri, un tampon eficient oferă formularea cu efecte secundare nedorite, cum ar fi durere la injecție pentru tampoane de citrat. Toate tampoanele au dezavantajul inerent de a fi un ingredient suplimentar în formulare care complică procesul de formulare, prezintă un risc de afectare dăunătoare a altor ingrediente, stabilitate, termen de valabilitate și acceptabilitate pentru
 50 utilizatorul final.

Inventatorii prezentei, totuși, au furnizat în mod surprinzător formulări în care nu există tampon, în timp ce formulările nu suferă de nici o fluctuație inacceptabilă a pH-ului. Formulările cuprind arginină ca un compus stabilizator. Arginina ar avea o capacitate de tampon așteptată de +/- 1 unități de pH în jurul pKa, care este la 2,17, la 12,5 și la 9,04. Astfel, nu a fost așteptată nici o
 55 capacitate de tamponare în intervalul de pH preferat al acestei invenții (de ex., între 6,0 și 7,5, mai preferat între 6,5 și 7,4, de preferință la sau în jurul a 6,8). Cu toate acestea, s-a descoperit surprinzător că arginina are o puternică influență stabilizatoare asupra pH-ului în formulările particulare descrise aici. Nici un astfel de efect al argininei nu a fost descris nicăieri în stadiul tehnicii.

60 În mod avantajos, furnizarea acestei formulări fără un tampon așa cum este definit aici furnizează, de asemenea, o formulare cu durere redusă sau lipsită de durere la injecție și reducere

sau lipsă de iritație a pielii la injecție. Acest lucru este contrar formulărilor care de ex. utilizează tampon de citrat care s-a dovedit că duce la iritarea pielii și durere la injectare.

Arginina din această invenție poate fi arginină sau poate fi arginină HCl sau chiar mai preferată, L-arginină (HCl). Cantitatea de arginină este, de preferință, în intervalul cuprins între 50 și 160 mM, mai preferată 80 - 160 mM, chiar mai preferată la aprox. 150 mM.

După cum se poate vedea din exemplele de mai jos, arginina are un efect pronunțat asupra oxidării FSH și hCG. Cu toate acestea, inventatorii au prezentat un efect de stabilizare deosebit de ridicat. În mod surprinzător, au reușit apoi să furnizeze o formulare lichidă de gonadotropină care a fost stabilă și a arătat doar o oxidare minimă (în niveluri acceptabile, a se vedea secțiunea de exemplu de mai jos), dacă gonadotropina a fost combinată cu o cantitate mare de stabilizare a argininei (de ex., 150 mM).

Acest lucru a fost deosebit de surprinzător, deoarece efectul a fost obținut într-un interval de pH îndepărtat de valorile pKa ale argininei, și anume într-un interval de pH cuprins între pH 6,0 și 7,5. Acesta este intervalul de pH preferat pentru prezenta invenție. Într-un exemplu de realizare preferat în mod special, pH-ul este în intervalul 6,5 până la 7,4. Chiar mai preferat este un interval de pH între 6,5 și 7,2. Cel mai preferat este un pH de 6,8 +/- 0,3.

În mod surprinzător, o cantitate scăzută de antioxidant de metionină, de preferință L-metionină, a fost capabilă să prevină evenimentele de oxidare nedorite. Această cantitate scăzută poate fi de până la 0,05 mg / ml, dar poate ajunge până la 2,5 mg / ml. Într-o variantă preferată, cantitatea de metionină este cuprinsă între 0,1 și 1,5 mg / ml. Într-o formă de realizare chiar mai preferată, cantitatea de metionină este între 0,1 și 1 mg / ml. Într-o variantă de realizare chiar mai preferată, cantitatea de metionină este cuprinsă între 0,1 și 0,5 mg / ml. Cea mai preferată variantă de realizare este metionina la 0,15 mg / ml. Nu s-ar fi putut prezice deloc că puterea mare de oxidare a argininei ar fi putut fi contracarată și depășită de o cantitate atât de mică de metionină.

Chiar și mai surprinzător a fost constatarea că arginina a avut un efect stabilizator mult mai pronunțat decât alți agenți stabilizatori cunoscuți, de ex. zaharoza, care este un stabilizator adăugat destul de frecvent și foarte bine stabilit.

Formulările pot include purtători, diluanți, solvenți și / sau vehicule farmaceutice apoase și neapoase adecvate. Exemplele de purtători, diluanți, solvenți sau vehicule farmaceutice apoase și neapoase adecvate includ apă, etanol, polioli (cum ar fi glicerol, propilenglicol, polietilenglicol și altele asemenea), carboxi-metilceluloză și amestecuri adecvate ale acestora, uleiuri vegetale (precum ulei de măsline) și esteri organici injectabili precum oleat de etil.

Mai preferată, în special pentru formulările multidoză, în prezenta invenție este adăugarea unui conservant. Foarte preferat acest conservant este fenolul. Într-o altă variantă preferată, fenolul este adăugat la o concentrație de 4,0 până la 6,0 mg / ml, de preferință 5,0 mg / ml fenol. În mod surprinzător, fenolul este, de asemenea, avantajos în contextul formulării specifice prezente, comparativ cu alți conservanți bine cunoscuți, prin faptul că nu duce la o colorare și este foarte stabil, chiar și pe o perioadă prelungită de timp, în ciuda prezenței acestui conservant, așa cum se arată în secțiunea de exemple.

Mai preferată în prezenta invenție este adăugarea unui agent activ de suprafață. Foarte preferat acest agent activ de suprafață este un polisorbit, chiar mai preferat polisorbit 20. Într-o altă variantă preferată, polisorbitul 20 este adăugat la o concentrație de 0,001 - 0,05 mg / ml, de preferință 0,005 mg / ml polisorbit 20. În mod avantajos, formularea acestei invenții, compusă cu polisorbit 20, nu duce la turbiditate și este foarte stabilă, chiar și pe o perioadă prelungită de timp, în ciuda prezenței acestui conservant, așa cum se arată în secțiunea de exemple.

Compozițiile pot conține, de asemenea, aditivi suplimentari pe lângă cei deja enumerați mai sus, cum ar fi, dar fără a se limita la conservanți (suplimentari), agenți de umectare, agenți de emulsionare și agenți de dispersare. Agenții antibacterieni și antifungici pot fi incluși pentru a preveni creșterea microbilor și includ, de exemplu, parabeni, clorobutanol, fenoli, acid sorbic și altele asemenea. Mai mult, poate fi de dorit să se includă agenți de tonicitate. Prezenta formulare inventivă totuși **nu cuprinde**

un tampon suplimentar.

În unele cazuri, pentru a efectua o acțiune prelungită, este de dorit să se încetinească absorbția gonadotropinei(lor), cum ar fi FSH (și alte ingrediente active, dacă sunt prezente) din injecția subcutanată sau intramusculară. Acest lucru poate fi realizat prin utilizarea unei suspensii lichide de material cristalin sau amorf cu solubilitate redusă în apă. Viteza de absorbție depinde apoi de viteza de dizolvare care, la rândul său, poate depinde de mărimea cristalului și de forma cristalină. Alternativ, absorbția întârziată a unei forme combinate de FSH administrată parenteral se realizează prin dizolvarea sau suspendarea combinației FSH într-un vehicul uleios.

Conform prezentei invenții, inventatorii au făcut un efort pentru a investiga efectul anumitor compuși asupra stabilității unei formulări lichide de gonadotropină; aici, s-au investigat

efectele de stabilizatoare și destabilizare ale mai multor compuși. În plus, inventatorii au căutat să îmbunătățească formularea rezultată în ceea ce privește claritatea, gradul de colorare și durerea la injecție.

Termenul „stabilitate” se poate referi la stabilitatea chimică, care implică modificarea covalentă în secvența de aminoacizi, dar în contextul stabilității proteinelor se poate referi și la stabilitatea fizică, care implică modificări ale stării de pliere a proteinelor (adică a stării native) neincluzând clivajul legăturii covalente.

În prezenta invenție, termenul "stabilitate" se referă la bio-stabilitatea formulărilor de gonadotropine, în special FSH și hCG. Instabilitatea fizică a unei formulări proteice poate fi cauzată de agregarea moleculelor de proteine pentru a forma agregate de ordin superior, de disocierea heterodimerilor în monomeri sau de orice altă modificare conformațională care reduce cel puțin o activitate biologică, de ex., proteine FSH (și alte ingrediente active, dacă sunt prezente) incluse în prezenta invenție.

O soluție sau formulare "stabilă" este una în care gradul de, agregare, disociere, modificare conformațională, pierderea activității biologice și altele asemenea, a proteinelor din ele este controlat acceptabil și nu crește inacceptabil în timp. Stabilitatea poate fi evaluată prin metode binecunoscute în domeniu, inclusiv măsurarea dispersiei luminii unei probe, inspecția vizuală a clarității și / sau colorării, absorbanței sau densității optice, determinări ale dimensiunii moleculare (de ex. prin cromatografie de excludere a mărimii sau fracționarea fluxului de câmp), activitate biologică *in vitro* sau *in vivo* și / sau prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC).

Prezenta formulare este stabilă timp de 12 luni în condiții de depozitare, de preferință 16 luni în condiții de depozitare, chiar mai preferată timp de 24 de luni, chiar mai preferabil timp de 24 de luni în condiții de depozitare plus 1 lună „în utilizare”, adică la temperatura camerei. Stabilitatea la „condiții de depozitare” se referă la depozitarea formulării într-un mediu răcit, de ex. la $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. "Temperatura camerei" în contextul prezent se referă la 30°C sau sub 30°C , preferabil $15 - 25^{\circ}\text{C}$, preferabil $18 - 25^{\circ}\text{C}$, cel mai preferat $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Pentru a determina stabilitatea în contextul prezentei formulări s-au folosit teste bine (imuno)cunoscute pentru FSH și hCG, care sunt bine cunoscute de către specialiștii în domeniu și descrise aici în consecință numai în termeni generali după cum urmează:

RP-HPLC pentru oxidare

Oxidarea proteinelor a fost determinată prin RP-HPLC, prin eluție cu gradient pe o coloană C4 și detectare UV la 210 nm.

Test de fluorescență a enzimei legate (ELFA)

Imunoactivitatea FSH și hCG a fost determinată printr-un imunotest sandwich efectuat folosind un instrument VIDAS® cu analizor automat (BioMerieux, Franța) cu kituri VIDAS® corespunzătoare FSH și respectiv hCG.

Cromatografie de excludere a dimensiunii (SEC)

Puritatea rFSH a fost determinată cu cromatografie de excludere a mărimii (SEC) pe o coloană SEC cu proteine de 3-70 kDa și detectare UV la 210 nm.

Cromatografie de interacțiune hidrofobă (HIC)

Puritatea rhCG a fost determinată cu cromatografie de interacțiune hidrofobă (HIC) prin eluare în gradient pe o coloană cu grupări alchil amidă și detectare UV la 220 nm.

Biotestare FSH și LH

Potența FSH și LH au fost determinate utilizând teste biologice *in vivo*; Testul Steelman-Pohley (FSH) și, respectiv, testul de creștere în greutate a veziculelor seminale (LH).

Alte metode pentru evaluarea stabilității sunt bine cunoscute în domeniu și pot fi, de asemenea, utilizate în conformitate cu prezenta invenție.

Testele de activitate ale FSH și LH sunt standardizate utilizând Fourth International Standard for Urinary FSH and Urinary LH, noiembrie 2000, de către Comitetul de experți pentru standardizarea biologică a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS ECBS) și sunt bine cunoscute persoanei calificate în domeniu.

Se știa că mai mulți conservanți au un efect destabilizator pronunțat asupra formulărilor de gonadotropină și s-a constatat surprinzător că formularea inventivă descrisă, în special cuprinzând arginină și metionină, dar nu tampon, a fost deosebit de stabilă - chiar și pe o perioadă prelungită de timp și chiar și în prezenta fenolului.

Combinăția revendicată în prezenta de arginină și metionină are un efect stabilizator asupra unei formulări lichide de hMG care este într-o manieră avantajoasă și surprinzătoare chiar mai pronunțată decât efectele stabilizatoare ale stabilizatorilor cunoscuți, cum ar fi de ex. zaharoză. Efectul de stabilizare îmbunătățit comparativ cu stabilizatorii cunoscuți precum zaharoza este deosebit de surprinzător. Mai mult, destul de neașteptate, efectele stabilizatoare ale combinației inventive au fost pronunțate în ciuda absenței unui tampon.

Din stadiul tehnicii s-a știut că există degradarea FSH în formulările farmaceutice de FSH și acest lucru a fost confirmat de exemplele furnizate în WO 2012/013742. FSH se va degrada atât în funcție de timp, cât și în funcție de temperatură.

Se pare că desfășurarea conformațională a structurilor FSH terțiare și secundare care apar la încălzire este o tranziție în două stări (când agregarea proteinelor este limitată). Această desfășurare poate fi independentă de disocierea subunității (modificări ale structurii cuaternare).

Mai mult, a devenit clar în stadiul tehnicii că FSH, conținând un conservant precum alcoolul benzilic sau fenolul, unde acești conservanți sunt necesari, de exemplu ca agenți antimicrobieni în formulările lichide de FSH, afectează în mod clar stabilitatea formulărilor multidozei de FSH într-un mod negativ. Aici, stabilitatea pe termen lung a FSH este scăzută, temperatura de denaturare a FSH este mai mică și formele deja denaturate au un nivel mai scăzut de structuri secundare decât formulările de FSH care nu conțin conservanți.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la o metodă de stabilizare a unei formulări lichide de gonadotropină în care metoda cuprinde etapa de adăugare a argininei și metioninei la formularea menționată, care nu cuprinde un tampon.

LISTA FIGURILOR

Figura 1: Curba de titrare. Panta curbilor arată capacitatea tamponului, de ex. o pantă abruptă descrie o capacitate a tamponului redusă.

Figura 2: Optimizator de răspuns pe baza rezultatelor la 25°C. Liniile verticale arată nivelul de L-arginină și L-metionină și răspunsurile în imunotestul FSH și hCG ca Y (în UI/ml). R^2_{HCG} : 92,15% și R^2_{FSH} : 67,31%.

Toate studiile au fost confirmate de datele efectuate suplimentar în timp real.

EXEMPLE

Exemplul 1

1 Context și introducere

Mai multe produse medicamentoase diferite care conțin hormoni gonadotropinici derivați din urina femeilor aflate în postmenopauză sau gravide sunt utilizate în tratamentul infertilității, cum ar fi preparatele hMG (gonadotropină umană la menopauză). hMG posedă activitate de hormon folliculostimulant (FSH) și hormon luteinizant (LH) într-un raport de unu la unu.

FSH, LH și gonadotropina corionică umană (hCG) aparțin familiei gonadotropinelor de hormoni glicoproteici complecși. Sunt heterodimeri compuși dintr-o subunitate α - și β . Subunitatea α de 92 aminoacizi este comună pentru aceste trei gonadotropine, subunitățile β sunt unice, oferindu-le caracteristicile lor biologice diferite (Wolfenson C. și colab. 2005, Batch-to-batch consistency of human-derived gonadotropin preparations compared with recombinant preparations. BioMedicină reproductivă. Vol 10 Nr. 4:442-454; Shen, S. T., Cheng, Y. S., Shen, T. Y., și Yu, J. Y. 2006, Molecular cloning of follicle-stimulating hormone (FSH)-beta subunit cDNA from duck pituitary. Gen. Comp Endocrinol. 148:388-394; Fox, K. M., Dias, J. A., și Van, R. P. 2001, Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. Mol. Endocrinol. 15:378-389; Burova, T., Lecompte, F., Galet, C., Monsallier, F., Delpech, S., Haertle, T., și Combarrous, Y. 2001, Conformational stability and in vitro bioactivity of porcine luteinizing hormone. Mol. Cell Endocrinol. 176:129-134. Hormonii glicoproteici își pierd toți bioactivitatea la disocierea subunităților legate necovalent (Alevizaki, M. and Huhtaniemi, I. 2002, Structure-function relationships of glycoprotein hormones; lessons from mutations and polymorphisms of the thyrotrophin and gonadotropin subunit genes. Hormones. (Athens.) 1:224-232).

LH și hCG se leagă de același receptor și, prin urmare, ambii posedă activitate LH. In hMG activitatea LH provine în principal din hCG

Scopul prezentei invenții este de a dezvolta o formulare de gonadotropină ca formulare lichidă, pentru injecție subcutanată. Pentru injecția multidoză, este de obicei necesară adăugarea unui conservant (Meyer, B. K., Ni, A., Hu, B. și Shi, L. 2007, Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present. J. Pharm. Sci. 96:3155-3167; Chang, B. S. și Hershenson, S. Practical Approaches to Protein Formulation Development. In Rational Design of Stable Protein Formulations. Editori J. F. Carpenter și M. C. Manning. 2002, Plenum Publ., New York. 1-25; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. 2000, CRC Press, Boca Raton).

Ca în general, structura nativă (bioactivă) a proteinelor este foarte sensibilă la mediul înconjurător, de ex. compoziția formulării, containerul / sistemele de închidere, pH-ul și temperatura, fiind o faptă dificilă identificarea unei formulări lichide adecvate pentru gonadotropine, au fost selectați diferiți excipienți. În lucrarea de față, capacitatea tamponului și stabilitatea în timp real a diferitelor formulări hMG sunt investigate folosind un imunotest de FSH,

un imunotest de hCG, un biotest, RP-HPLC pentru determinarea proteinelor oxidate, titrare și pH așa cum este descris mai jos în detaliu.

2 Produs de studiat

2.1 Materiale

5 2.1.1 Substanța medicamentoasă (DS)

Substanța medicamentoasă hMG-HP (DS) a fost fabricată de Instituto Massone S.A. Argentina. hMG-HP DS este primit sub formă de pulbere de către Ferring Pharmaceuticals A / S, Copenhaga, Danemarca.

10 Determinarea activității biologice a FSH și LH în substanța medicamentoasă a fost efectuată în conformitate cu versiunea actuală a Farmacopeei Britanice (BP). De asemenea, este posibil, dacă se dorește, să se efectueze această determinare în conformitate cu versiunea USP 35. Bioactivitatea FSH: LH în hMG este 1: 1 și, prin urmare, bioactivitatea medie determinată a FSH și LH este utilizată pentru compunerea în produsul medicamentos. Prin urmare, atunci când concentrația de hMG este dată de ex. 625 UI / ml este egal cu o bioactivitate de 625 UI / ml FSH și

15 2.1.2 Excipienți

O listă a excipienților utilizați în această lucrare este descrisă în Tabelul 1.

Tabelul 1 Lista de excipienți

Denumire	Calitate	Fabricant
Pelete de hidroxid de sodiu	Ph Eur, BP, JP, NF	Merck
Acid clorhidric, fumans 37%	Ph Eur, BP, JP, NF	Merck
Acid citric monohidrat	Ph Eur, BP, JPE, USP	Merck
Acid orto-fosforic 85%	Ph Eur, BP, JPE, NF	Merck
Citrat de tri-sodiu dihidrat	Ph Eur, BP, JPE, USP	Merck
Hidrogen fosfat di-sodic dodecahidrat	Ph Eur, BP, JPE, USP	Merck
L-histidină	EMPROVE® exp Ph Eur, USP	Merck
L-metionină	USP, multicompendial	J.T. Baker
L-arginină	Ph Eur, USP	Merck
L-arginină monoclorhidrat	Grad Farma, EP, JP, USP	Sigma-Aldrich
Sucroză	EMPROVE® exp Ph. Eur, BP, JPE, NF	Merck
D-(+)-trehaloză dehidratată	≥99%, cGMP	Sigma-Aldrich
Manitol	EMPROVE® Ph Eur, BP, USP, JPE	Merck
Lactoză monohidrat	Ph Eur, BP, NF, JP	Merck
Glicină	EMPROVE® Ph.Eur., BP, JPE, USP	Merck
Clorură de sodiu	EMPROVE, Ph.Eur., BP, USP	Merck
Polisorbat 20	Ph.Eur, NF, JPE	J.T. Baker
Poloxamer 188	Adecvat pentru bio. Pharm. Production, Ph.Eur., NF	Merck
Fenol	Ph.Eur, JP, USP	Merck
Meta-crezol	Ph. Eur. / USP grad parenteral	Hedinger
Apă Milli-Q	-	Millipore

20 2.1.3 Sistem de închidere a containerului

Pentru studiile de stabilitate, principalele materiale de ambalare au fost flacoane de sticlă cu dopuri de cauciuc și capace din aluminiu / plastic sau cartușe de sticlă cu piston de cauciuc și capace de sertizare.

3 Procedura de fabricare

25 3.1 Compoundare

Toate formulări sunt manufacturate la scală de laborator.

Pentru compunerea soluției de produs medicamentos (DP), soluțiile stoc ale fiecărui excipient și substanță medicamentoasă (DS) sunt amestecate secvențial. Înainte de a adăuga hMG

și diluarea finală la volum, pH-ul fiecărei formulări este ajustat, atunci când este necesar. Soluțiile stoc ale tuturor excipienților și hMG sunt preparate în apă Milli-Q.

3.2 Filtrare sterilă și încărcare aseptică

Formulările pentru stabilitate sunt filtrate steril cu filtru Millipore PVDF 0,22 μm. Filtrarea sterilă se efectuează într-un banc LAF folosind materiale autoclavizate.

Umplerea se efectuează după filtrare. Recipientele sunt umplute cu soluție de probă. Toate flacoanele și cartușele sunt umplute în condiții aseptice, într-un banc LAF și imediat închise cu dopuri de cauciuc sau capace de sertizare. În afara bancului LAF, flacoanele umplute sunt sigilate cu capace din aluminiu.

4 Condiții de stocare

4.1 Condiții de stocare

Recipientele care conțin formulări de produse medicamentoase sunt depozitate în condiții accelerate timp de până la 3 luni la $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ RH}$ și/sau pentru până la minimum 6 luni la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{ RH}$. La fiecare temperatură de depozitare, recipientele sunt depozitate în poziții verticale. Cartușele sunt stocate orizontal. Toate recipientele sunt protejate de lumină.

5 Metode analitice

Metodele analitice utilizate în studii sunt descrise mai jos.

5.1 Procedură de titrare

Conform USP-NF așa cum s-a descris anterior, se spune că o soluție este tamponată dacă rezistă schimbărilor în activitatea unui ion la adăugarea de substanțe care se așteaptă să modifice activitatea aceluși ion. Tamponurile sunt substanțe sau combinații de substanțe care conferă această rezistență unei soluții. Soluțiile tamponate sunt sisteme în care ionul este în echilibru cu substanțe capabile să îndepărteze sau să elibereze ionul. Capacitatea tamponului se referă la cantitatea de material care poate fi adăugată la o soluție fără a provoca o schimbare semnificativă a activității ionilor. Este definit ca raportul dintre acid sau bază adăugată (în echivalenți gram / l) la modificarea unităților de pH. Capacitatea unei soluții tamponate este ajustată la condițiile de utilizare, de obicei prin ajustarea concentrațiilor de substanțe tampon.

Capacitatea tamponului este exprimată în mod obișnuit ca numărul de echivalenți (Eq) de acid sau bază puternică care determină un litru de soluție în cauză să sufere o modificare a unității de pH, dând unitatea mEq / (litru $\times$ pH) care a fost utilizată pentru determinarea capacității tamponului din prezenta invenție.

Aceasta înseamnă că capacitatea tamponului este definită ca numărul de moli (echivalenți) de H^+/OH^- necesar pentru a modifica pH-ul unei soluții tampon de un litru cu o unitate.

Capacitatea tamponului a fost determinată folosind o formulare placebo (placebo se referă aici la formulări fără ingredient activ), ajustată la pH-ul țintă ca punct de plecare. S-a utilizat NaOH / HCl 0,2 N pentru a titra pH-ul în sus sau în jos. pH-ul a fost măsurat după fiecare adăugare de 0,2 N NaOH / HCl și s-a documentat volumul de 0,2 N NaOH / HCl. Cantitatea de NaOH 0,2 N/HCl a fost reprezentată grafic ca valori X și pH ca valori Y. Regresia liniară montată a fost efectuată în jurul valorii de pH 6,8 pentru hMG placebo (pH țintă) și în jurul valorii de pH 6,5 pentru placebo de referință (pH țintă). Capacitatea tamponului poate fi calculată ca ?l HCl 0,2 N / NaOH pentru a muta pH-ul cu 0,01 unitate de pH / l DP și ca miliechivalenți (mEq) acid sau bază / (litru $\times$ unitate de pH), așa cum este descris mai sus în definiție.

5.2 Imunoteste FSH și hCG

Imunotestele FSH și hCG s-au determinat prin sandwich ELFA.

5.3 Proteine oxidate

Oxidarea proteinelor s-a determinat prin RP-HPLC.

pH 5,4

pH-ul s-a măsurat în conformitate cu Ph. Eur.

6 Rezultate

Rezultatele studiilor de stabilitate, evaluarea agentului tampon într-un studiu de capacitate a tamponului, precum și rezultatele stabilității din studiul Design of Experiment (DoE) sunt prezentate mai jos.

Tabelul 2 Compoziția formulărilor lichide hMG (600 UI / ml)

Lot nr.	Tampon	Surfactant	Conservant	Stabilizator/tonicitate	Agent
E-01	10 mM fosfat ¹ pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbit 20	3,0 mg/ml M-crezol	41,3 mg/ml manitol	
E-02	10 mM fosfat ¹ pH	0,005 mg/ml	3,0 mg/ml M-	85,9 mg/ml trehaloză	

Lot nr.	Tampon	Surfactant	Conservant	Stabilizator/tonicitate	Agent
	6,8	polisorbat 20	crezol		
E-03	10 mM fosfat ¹ pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	3,0 mg/ml M-crezol	74,3 mg/ml	sucroză
E-04	10 mM fosfat ¹ pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	3,0 mg/ml M-crezol	18,8 mg/ml	glicină
E-05	10 mM fosfat ¹ pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	67,7 mg/ml	sucroză
E-06	10 mM fosfat ¹ pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	6,8 mg/ml	NaCl
E-07	10 mM fosfat ¹ pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	5,0 mg/ml fenol	37,6 mg/ml	manitol
E-08	10 mM citrat ² pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	3,0 mg/ml M-crezol	71,1 mg/ml	sucroză
E-09	10 mM citrat ² pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	3,0 mg/ml M-crezol	29,3 mg/ml	L-arginină HCl
E-10	10 mM citrat ² pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	3,0 mg/ml M-crezol	39,5 mg/ml	manitol
E-11	10 mM citrat ² pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	74,7 mg/ml	trehaloză
E-12	10 mM citrat ² pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	5,0 mg/ml fenol	64,5 mg/ml	sucroză
E-13	10 mM citrat ² pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	5,0 mg/ml fenol	6,5 mg/ml	NaCl
E-14	10 mM 2 histidină pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	3,0 mg/ml M-crezol	77,5 mg/ml	sucroză
E-15	10 mM 2 histidină pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	3,0 mg/ml M-crezol	19,6 mg/ml	glicină
¹ 10 mM hidrogen fosfat di-sodic dodecahidrat, pH ajustat cu acid fosforic					
² 10 mM citrat tri-sodic dihidrat, pH ajustat cu acid citric					

6.1 Stabilitatea formulării de hMG lichide/3 luni

Moleculele proteice pot fi stabilizate prin adăugarea de excipienți la soluție, de ex. săruri, carbohidrați sau aminoacizi, dar gradul de stabilizare la adăugarea diferiților carbohidrați, săruri și aminoacizi variază masiv între diferite formulări. Aici, studiile inițiale de stabilitate au fost efectuate pentru a selecta diferiți stabilizatori în combinație cu conservanți și tampoane într-o formulare lichidă de hMG. În mod surprinzător, rezultatele arată un efect stabilizator superior al L-argininei, așa cum se arată în Tabelele 3 și 6 pentru imunotestul hCG și în Tabelele 4 și 7 pentru imunotestul FSH.

Formularea E-09 prezintă o stabilitate superioară comparativ cu toate celelalte formulări. Formularea E-09 este singura formulare care conține L-arginină (vezi Tabelul 2). Formularea K-01, K-03 și K-04, precum și K-09 prezintă stabilitate superioară comparativ cu toate celelalte formulări (vezi Tabelul 6). Aceste formulări conțin din nou L-arginină (vezi Tabelul 5). În Tabelul 4, formularea E-09 excelează cu cea mai bună stabilitate în comparație cu toate celelalte formulări, de asemenea, pentru imunotestarea FSH și Tabelul 7 confirmă faptul că formularea K-09 arată cel mai mare rezultat imunotest al FSH comparativ cu toate celelalte formulări.

Tabelul 3 Imunotestare hCG timp de 1 lună de stocare la $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ HR}$. Formularea E-09 prezintă stabilitate superioară comparativ cu toate celelalte formulări. Formularea E-09 conține L-arginină, vezi Tabelul 2.

hCG [% din inițial]		$30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ RH}$	
Formulare	Initial	0,5 lună	1 lună
E-01	100	91	85
E-02	100	88	87
E-03	100	87	80
E-04	-	-	-
E-05	100	83	81
E-06	100	101	100
E-07	100	89	87
E-08	100	89	81
E-09 (L-arginină)	100	113	106
E-10	100	95	91
E-11	100	99	89
E-12	100	94	87
E-13	100	99	86
E-14	-	-	-
E-15	-	-	-

(Formulările E-04, E-14 și E-15 excluse din testare datorită colorării)

Tabelul 4 Imunotestarea FSH după 3 luni de stocare la $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ HR}$. Formularea E-09 prezintă stabilitate superioară comparativ cu toate celelalte formulări. Formularea E-09 conține L-arginină, vezi Tabelul 2.

FSH [% din inițial]		$30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ HR}$
Formulare	Initial	3 luni
E-01	100	83
E-02	100	77
E-03	100	83
E-04	-	-
E-05	100	84
E-06	100	86
E-07	100	86
E-08	100	84
E-09 (L-arginină)	100	95
E-10	100	83
E-11	100	83
E-12	100	89
E-13	100	85
E-14	-	-
E-15	-	-

(Formulările E-04, E-14 și E-15 excluse din testare datorită colorării)

6.2 Stabilitatea formulării de hMG lichide/3 luni

Din screeningul inițial au fost selectate formulări suplimentare cu arginină.

- 5 Tabelul 5 Studiu de stabilitate a compoziției pentru hMG lichid 600 UI / ml - Prezentare generală a formulărilor

Lot nr.	Tampon	Surfactant	Conservant	Antioxidant	Stabilizator/ Agent tonicitate
---------	--------	------------	------------	-------------	-----------------------------------

Lot nr.	Tampon	Surfactant	Conservant	Antioxidant	Stabilizator/ Agent tonicitate
K-01 ¹	10 mM citrat ⁵ pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	3,0 mg/ml M-crezol	1,5 mg/ml L-metionină	28,0 mg/ml L-arginină HCl
K-02	1 mM fosfat ⁴ pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	3,0 mg/ml M-crezol	1,0 mg/ml L-metionină	21,0 mg/ml lactoză 7,0 mg/ml NaCl
K-03	10 mM citrat ⁵ pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	5,0 mg/ml fenol	1,5 mg/ml L-metionină	25,3 mg/ml L-arginină HCl
K-04	10 mM fosfat ⁴ pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	3,0 mg/ml M-crezol	1,5 mg/ml L-metionină	29,3 mg/ml L-arginină HCl
K-05 ²	10 mM citrat ⁵ pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	5,0 mg/ml fenol	1,0 mg/ml L-metionină	67,4 mg/ml sucroză
K-06	10 mM citrat ⁵ pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	3,0 mg/ml M-crezol	1,0 mg/ml L-metionină	74,6 mg/ml sucroză
K-07 ³	10 mM citrat ⁵ pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	3,0 mg/ml M-crezol	1,0 mg/ml L-metionină	38,3 mg/ml manitol
K-08	10 mM citrat ⁵ pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	5,0 mg/ml fenol	1,0 mg/ml L-metionină	34,7 mg/ml manitol
K-09 ⁶	10 mM citrat ⁵ pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	3,0 mg/ml M-crezol	1,5 mg/ml L-metionină	20 mg/ml L-arginină HCl 22,1 mg/ml sucroză

¹ La fel ca formularea E-09 în tabelul 2
² La fel ca formularea E-12 în tabelul 2
³ La fel ca formularea E-10 în tabelul 2
⁴ 10 mM hidrogen fosfat di-sodic dodecahidrat, pH ajustat cu acid fosforic
⁵ 10 mM citrat tri-sodic dihidrat, pH ajustat cu acid citric
⁶ Tăria este 530 UI/ml

Imunotestare hCG în timp de 3 luni de stocare la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR

Tabelul 6

Formulările K-01, K-03, K-04 și K-09 prezintă stabilitate superioară comparativ cu toate celelalte formulări. Formulările K-01, K-03, K-04 și K-09 conțin L-arginină, vezi Tabelul 5

hCG [% of initial]		25°C ± 2°C/65 ± 5% RH		
Formulare	Initial	1 lună	2 luni	3 luni
K-01 (L-arginină)	100	110	105	105
K-02	100	100	68	57
K-03 (L-arginină)	100	110	106	104
K-04 (L-arginină)	100	109	106	113
K-05	100	94	82	71
K-06	100	98	76	80
K-07	100	85	74	67
K-08	100	93	79	71
K-09 (L-arginină)	100	99	101	100

Foarte clar, formulările care conțin L-arginină sunt mult mai stabile decât cele care conțin diferiți agenți de stabilizare. Comparați de ex. formularea K-02 și K-03 după trei luni.

Imunotestarea FSH timp de 3 luni de stocare la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{ RH}$
Formularea K-09 arată un rezultat al imunotestului FSH mai mare comparativ cu toate celelalte formulări.
Formularea K-09 conține L-arginină, vezi Tabelul 5

FSH [% of initial]		25°C ± 2°C/60 ± 5% RH		
Formulare	Initial	1 lună	2 luni	3 luni
K-01 (L-arginină)	100	112	112	111
K-02	100	104	106	87
K-03 (L-arginină)	100	108	120	107
K-04 (L-arginină)	100	108	112	112
K-05	100	107	116	111
K-06	100	109	117	115
K-07	100	101	112	104
K-08	100	107	107	109
K-09 (L-arginină)	100	112	120	119

Rezultatele pentru hCG sunt confirmate și pentru FSH - comparate de ex. formularea K-02 și K-03 după trei luni.

6.3 Studiul capacității tamponului

- 5 Agenți tampon de ex. fosfatul de sodiu și citratul de sodiu sunt tamponate tolerate fiziologic și se adaugă destul de frecvent pentru a menține pH-ul într-un interval dorit. Citratul tri-sodic dihidrat și hidrogen fosfat di-sodic dodecahidrat sunt evaluați ca agenți tampon prin intermediul capacității tampon. Capacitatea tamponului este calculată ca cantitatea de acid sau bază necesară pentru a muta pH-ul cu o etapă predefinită, adică cantitatea de μl HCl 0,2 N / NaOH necesară pentru a muta pH-ul cu 1 unitate de pH / l DP calculată ca acid mEq sau bază / (litru × unitate pH) așa cum s-a explicat mai sus.

Tabelul 8 Studiul capacității compoziției de tampon - Prezentări generale

Lot nr.	Tampon	Surfactant	Conservant	Antioxidant	Stabilizator/ Agent tonicitate
C-01	Fără tampon pH 6,8	0,005 mg/ml Polisorbat 20	5,0 mg/ml Fenol	1,5 mg/ml L- metionină	120 mM L-arginină HCl ⁴
C-02	5 mM citrat ¹ pH 6,8	0,005 mg/ml Polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	1,5 mg/ml L- metionină	120 mM L-arginină HCl ⁴
C-03	10 mM citrat ¹ pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	1,5 mg/ml L- metionină	120 mM L-arginină HCl ⁴
C-04 ³	1 mM ² fosfat pH 6,5	0,005 mg/ml polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	1,0 mg/ml L- metionină	31,76 mg/ml Na ₂ SO ₄ x 10 H ₂ O (14 mg/ml sulfat de sodiu)
1 citrat de tri-sodiu dihidrat 2 0,8 mM Na ₂ HPO ₄ ? 12 H ₂ O și aprox. 0,2 mM H ₃ PO ₄ până la pH 6,5 3 Referință placebo 4 Egal la 25,3 mg/ml L-arginină HCl					

- 15 Rezultatul titrării efectuate pentru a determina capacitatea tamponului este prezentat în Figura 1. Panta curbelor arată capacitatea tamponului, de ex. o pantă abruptă reprezintă o capacitate tampon redusă. Din Figura 1 se poate observa că lotul C-04 (formulare de referință) are cea mai mică capacitate tampon. În zona de pH relevantă $6,8 \pm 0,3$ pentru hMG, toate formulările hMG C-01 (fără tampon), C-02 (5 mM citrat de sodiu dihidrat) și C-03 (10 mM citrat tri-sodic

dihidrat) au tampon similar și o capacitate tampon mai mare decât formularea de referință conținând 1 mM hidrogen fosfat di-sodic dodecahidrat. pH-ul țintă pentru formularea de referință este de 6,5. Formularea C-01, C-02 și -03 sunt comparate cu referința despre care se știe că are un pH stabil. Numeroase studii de stabilitate ale formulării de referință C-04 au fost efectuate fără

5 nicio derivare observată a pH-ului.

Următorul Tabel 9 prezintă rezultatele studiului capacității tamponului:

Tabelul 9 Studiul capacității tamponului. În zona de pH relevant al formulării 6,8 pentru hMG, toate formulările hMG au o capacitate a tamponului mai mare decât formularea placebo de referință.

Lot	Tampon	Capacitatea tamponului în jurul unui pH țintă	domeniul pH-ului	α (panta)	Capacitate tampon exprimată ca: mEq acid sau bază / (litru $\times$ unitate pH)
C-01	Fără tampon	6,8	6,564 - 6,947	0,001507).	1,32
C-01	Fără tampon	7,0	6,786 - 7,193	0,000822).	2,44
C-02	5 mM citrat tri-sodic dihidrat	6,8	6,599 - 6,951	0,000672).	2,96
C-03	10 mM citrat tri-sodic dihidrat	6,8	6,572 - 6,946	0,000750).	2,66
C-04 (referință)	1 mM Hidrogen fosfat di-sodic dodecahidrat	6,5	6,199 - 6,752	0,002700).	0,74
C-04 (referință)	1 mM Hidrogen fosfat di-sodic dodecahidrat	6,8	6,582 - 6,982	0,002091).	0,96
(C-01 și C-04 sunt menționate de două ori, deoarece capacitatea tamponului a fost calculată în intervale de pH în jurul a două valori de pH diferite, respectiv)					

10

În mod surprinzător, capacitatea tamponului formulării hMG fără tampon (C-01) este mai mare decât formularea de referință C-04. Componenta principală a excipientului în formularea hMG este L-arginina la o concentrație de 120 mM. Valorile pKa pentru L-arginină sunt $pK_{a1} = 2,17$; $pK_{a2} = 9,04$ și $pK_{a3} = 12,5$ (Handbook of Pharmaceutical Excipients. 2015, Pharmaceutical Press, Londra). Este foarte neașteptat că arginina prezintă un comportament de tamponare suficient de departe de valorile pKa.

15

6.4 Studii de oxidare

După 3 luni de depozitare la $30 \pm 2^\circ\text{C}$ / $65 \pm 5\%$ HR, formularea E-09 conținând L-arginină (vezi Tabelul 5) a crescut nivelul proteinelor oxidate cu 241% din valoarea inițială (vezi tabelul 10 de mai jos). Aceasta este o cantitate foarte mare și există cazuri în care cantități atât de mari de oxidare nu sunt de dorit.

20

Prin urmare, au fost efectuate studii suplimentare pentru a cerceta dacă această problemă ar putea fi depășită.

25

Există mai multe opțiuni de antioxidanți care pot fi utilizați în formulările de proteine. Metionina poate fi adăugată pentru a preveni oxidarea, printr-un mecanism propus de concurență cu oxidarea reziduurilor de metionină din proteine. Rezultatul adăugării metioninei la o formulare care conține arginină este prezentat în Tabelul 10. Formularea K-01, K-03, K-04 și K-09 conține arginină și metionină, iar nivelul proteinelor oxidate este redus în mod clar și avantajos. Formularea K-01 (cu metionină) este aceeași formulare ca formularea E-09 (fără metionină). Comparând aceste două loturi, se poate observa că nivelul proteinelor oxidate este redus enorm de metionină.

30

Proteine oxidate în % crescute de la stocarea inițială timp de 3 luni la $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\%$ HR
Tabelul 10 Formularea E-09 conține arginină și fără metionină.
 Formularea K-01, K-03, K-04 și K-09 conțin arginină și metionină, vezi Tabelul 5

Proteine oxidate [% creștere din inițial]	$30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\%$ HR
Formulare	3 luni
E-01	44
E-02	39
E-03	47
E-04	-
E-05	37
E-06	43
E-07	36
E-08	51
E-09 (arginină și fără metionină)	241
E-10	55
E-11	47
E-12	53
E-13	46
E-14	-
E-15	-
K-01 (arginină și metionină)	24
K-03 (arginină și metionină)	12
K-04 (arginină și metionină)	8
K-09 (arginină și metionină)	13

(Formulările E-04, E-14 și E-15 excluse datorită colorării)

În concluzie, aceste două studii demonstrează un efect extraordinar de stabilizant al argininei și un efect anti-oxidant chiar și al unor cantități mici de metionină într-o formulare de gonadotropine.

5 6.5 Studiu de stabilitate DoE

Combinand rezultatele studiilor de mai sus și ale studiului capacității tamponului, s-a efectuat un studiu DoE pentru a investiga interacțiunile dintre arginină și metionină și pentru a determina concentrațiile optime ale acestor doi excipienți.

Tabelul 11 Compoziții pentru studiu de stabilitate DoE pentru hMG lichid 600 UI / ml -
Prezentare generală a formulărilor

Lot nr.	Tampon ²	Surfactant	Conservant	Antioxidant	Stabilizator/ agent de izotonicitate
D-01	Fără tampon pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	1,5 mg/ml L- metionină	80 mM L-arginină HCl
D-02	Fără tampon pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	1,5 mg/ml L- metionină	160 mM L-arginină HCl
D-03	Fără tampon pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	0,8 mg/ml L- metionină	120 mM L-arginină HCl
D-04	Fără tampon pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	0,8 mg/ml L- metionină	120 mM L-arginină HCl-
D-05	Fără tampon pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	0,1 mg/ml L- metionină	160 mM L-arginină HCl
D-06	Fără tampon pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	5,0 mg/ml fenol	0,1 mg/ml L- metionină	80 mM L-arginină HCl
D-07 ³	Fără tampon pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	5,0 mg/ml fenol	1,5 mg/L- metionină	120 mM L-arginină HCl
D-08 ³	10 mM citrat ¹ pH 6,8	0,1 mg/ml poloxamer 188	5,0 mg/ml fenol	1,5 mg/L- metionină	120 mM L-arginină HCl

Lot nr.	Tampon ²	Surfactant	Conservant	Antioxidant	Stabilizator/ agent de izotonicitate
¹ Citrat tri-sodic dehidrat ² pH este ajustat cu 0,2 N HCl/NaOH pentru formulări fără tampon și 0,2 N NaOH/0,5 M					
³ Acid citric monohidrat pentru formulare cu tampon citrat tri-sodic dihidrat Incluse ca formulări de referință					

6.5.1 Imunotestare FSH

Rezultatele stabilității imunotestului FSH în timpul depozitării timp de 3 luni la 25 ± 2°C/60 ± 5% RH sunt listate în Tabelul 12.

- 5 **Tabelul 12 Rezultate ale imunotestului FSH în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR. Descrierea completă a tuturor formulărilor este listată în Tabelul 11.**

FSH [UI/ml]		25°C ± 2°C/60 ± 5% RH		
Formulare	Inițial	1 lună	2 luni	3 luni
D-01	516	501	468	462
D-02	521	492	503	478
D-03	511	503	513	474
D-04	515	505	490	477
D-05	532	521	513	473
D-06	518	488	458	493
D-07	518	528	482	490
D-08	514	499	472	481

- 10 Calculul statistic a fost efectuat pentru activitatea FSH [UI / ml] pentru a evalua influența și interacțiunea argininei și -metioninei. Rezultatul evaluării statistice confirmă că L-arginina are o influență statistică semnificativă asupra rezultatelor stabilității imunotestului FSH. Metionina nu are nicio influență statistică semnificativă asupra rezultatelor stabilității imunotestului FSH. Nu există nici o interacțiune statistică semnificativă între arginină și metionină pentru acest parametru de răspuns.

6.5.2 Imunotestare hCG

- 15 Rezultatele stabilității imunotestului hCG în timpul depozitării timp de 3 luni la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR sunt listate în Tabelul 13.

Tabelul 13 Rezultate ale imunotestului hCG în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR. Descrierea completă a tuturor formulărilor este listată în Tabelul 11.

hCG [UI/ml]		25°C ± 2°C/60 ± 5% RH		
Formulare	Inițial	1 lună	2 luni	3 luni
D-01	83	82	75	56
D-02	87	83	93	76
D-03	93	93	88	70
D-04	86	91	87	70
D-05	90	98	92	85
D-06	87	85	72	61
D-07	93	92	88	71
D-08	91	96	94	81

- 20 Calculul statistic a fost efectuat pentru activitatea hCG [UI / ml] pentru a evalua influența și interacțiunea argininei și metioninei. Rezultatul evaluării statistice confirmă faptul că arginină are o influență semnificativă statistic asupra rezultatelor stabilității imunotestului hCG. Conținutul de metionină are o influență minoră la 25°C asupra rezultatelor stabilității imunotestului hCG. Devine clar că peste o concentrație scăzută (0,1 mg / ml) de metionină nu mai este detectabilă nici o creștere a stabilității prin creșterea concentrației chiar și până la 1,5 mg / ml. Nu există nici o interacțiune statistică semnificativă între arginină și metionină pentru acest parametru de răspuns.

25

6.5.3 Proteine oxidate

În studiile de stabilitate de mai sus s-a observat în mod surprinzător că prezența argininei are un efect extraordinar ca stabilizator. Cu toate acestea, adăugarea de arginină a dus la un nivel crescut de proteine oxidate. Metionina poate fi adăugată pentru a preveni această oxidare și acest studiu investighează echilibrul concentrației dintre arginină ca stabilizator și metionină ca antioxidant.

Rezultatele stabilității cantității de proteine oxidate [creștere % față de inițial] în timpul depozitării timp de 6 luni la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{ RH}$ și 3 luni la $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ RH}$ pentru formulări cu arginină și metionină (în domeniul concentrației 0,1-1,5 mg / ml) sunt enumerate mai jos. Pentru comparație, formularea E-09 cu arginină și fără metionină este, de asemenea, inclusă în Tabelul 14 Tabel.

Tabelul 14 Rezultate ale proteinelor oxidate în timpul depozitării la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{ RH}$ și $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ RH}$. Descrierea completă a tuturor formulărilor este dată în Tabelul 11.

Proteine oxidate [% de creștere de la inițial]	$30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ RH}$			$25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{ RH}$			
	1 luni	2 luni	3 luni	1 luni	2 luni	3 luni	6 luni
D-01	5,5	4,1	8,3	10,1	4,1	9,6	6,9
D-02	9,9	8,5	10,3	11,7	11,7	6,6	8,5
D-03	10,9	10,0	11,4	12,3	13,3	11,8	12,8
D-04	8,9	8,4	8,9	8,9	11,2	9,8	8,9
D-05	12,9	13,8	13,8	13,3	20,5	11,0	15,2
D-06	7,0	9,8	11,6	10,7	7,9	9,3	11,2
D-07	14,0	10,1	11,1	14,5	13,5	15,0	10,1
D-08	7,6	9,5	7,6	13,3	9,0	11,8	7,6
E-09 (fără L-metionină)	-	-	241	-	-	-	-

Din Tabelul 14 Tabelul se observă în mod surprinzător că chiar și cantități mici de metionină sunt suficiente pentru a preveni oxidarea în întreaga gamă de concentrații de arginină.

6.5.4 Sumarul DoE

Pentru a încheia și a rezuma rezultatele DoE, a fost aplicat optimizatorul de răspuns în Minitab, vezi Figura 2. Instrumentul Minitab Response Optimizer arată cât de diferite sunt setările factorilor experimentali, de ex. concentrațiile de arginină și metionină afectează răspunsurile prevăzute, de ex. imunotestare FSH [UI / ml] și imunotestare hCG [UI / ml] pentru proiectarea factorială. Graficul de optimizare arată efectul fiecărui factor (coloane) asupra răspunsurilor (rândurilor). Liniile verticale albe de pe grafic reprezintă setările curente ale factorului. Numerele afișate în partea de sus a unei coloane arată setările curente ale nivelului factorului (între paranteze pătrate). Liniile punctate orizontale și numerele corespunzătoare reprezintă răspunsurile pentru nivelul factorului curent. Optimizatorul de răspuns se va baza pe rezultate de la 25°C . Rezultatul aplicării optimizatorului de răspuns este prezentat în Figura 2. Cea mai bună stabilitate (dezirabilitatea compozitului) se obține la concentrații mari de arginină și concentrații scăzute de metionină.

6.6 Studiul de pH

În studiul de capacitate a tamponului s-a arătat că un agent tampon nu era necesar în formularea hMG, utilizând numai arginină pentru a stabili pH-ul în intervalul de pH dorit.

Pentru a confirma că pH-ul este menținut în timpul depozitării, acesta a fost măsurat pe parcursul a 6 luni de depozitare la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{ RH}$ și 3 luni la $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ RH}$. Rezultatele sunt listate în Tabelul 15.

pH-ul țintă pentru toate formulările a fost pH 6,8 și pH-ul tuturor formulărilor a fost 6,8 la momentul inițial. pH-ul a fost destul de stabil, dar a crescut ușor la aproximativ 6,9 după 2 luni și a menținut un pH în jurul a 6,9 de până la 6 luni de depozitare. Rezultatele de până la 6 luni de depozitare confirmă stabilitatea pH-ului în domeniul de concentrație testat de arginină.

Tabelul 15 Rezultatele studiului pH-ului

pH		$30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ RH}$		$25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{ RH}$		
Formulare	Inițial	2 luni	3 luni	2 luni	3 luni	6 luni
D-01	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
D-02	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8

pH		30°C ± 2°C/65 ± 5% RH		25°C ± 2°C/60 ± 5% RH		
Formulare	Inițial	2 luni	3 luni	2 luni	3 luni	6 luni
D-03	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-04	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-05	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-06	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-07	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-08	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9

7 Concluzii

Foarte surprinzător, capacitatea tamponului formulării hMG fără tampon este mai mare decăt cea de referință cu 1 mM hidrogen fosfat di-sodic dodecahidrat. Componenta principală a excipientului în formularea hMG este arginina. Valorile pKa pentru arginină sunt $pK_{a1} = 2,17$; $pK_{a2} = 9,04$ și $pK_{a3} = 12,5$. Este neașteptat ca arginina să prezinte un comportament de tamponare suficient de departe de valorile sale pKa. Rezultatele arată însă în mod clar că nu este nevoie de agent tampon suplimentar în formularea hMG în domeniul curent de pH. Arginina singură este suficientă pentru a menține pH-ul în intervalul de pH dorit. Stabilitatea pH-ului a fost confirmată în studiul DoE care a testat un interval de concentrație de arginină pe parcursul a 6 luni de depozitare la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{ HR}$ și 3 luni de depozitare la $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ HR}$ care a confirmat observațiile din studiul capacității tamponului.

S-a demonstrat că adăugarea de arginină la formularea lichidă hMG inventivă are un efect extraordinar de stabilizant asupra formulărilor lichide hMG. Cu toate acestea, s-a constatat că arginina duce la un nivel ridicat de proteine oxidate. S-a demonstrat că adăugarea de metionină previne oxidarea în comparație cu o formulare fără metionină.

Pe parcursul a 6 luni de depozitare la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\% \text{ HR}$ și 3 luni de depozitare la $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\% \text{ HR}$, s-a demonstrat că chiar și o concentrație mică de metionină previne oxidarea.

Concluzionând rezultatele acestor studii, se vede clar că adăugarea de arginină este suficientă pentru a menține pH-ul la nivelul dorit de pH. Adăugarea de arginină stabilizează formularea extraordinară de gonadotropină testată într-o formulare lichidă. Niciun alt aminoacid testat, zaharid sau sare nu a prezentat un efect de stabilizare similar. Nivelul proteinelor oxidate este crescut semnificativ prin adăugarea de arginină, totuși adăugarea unor cantități chiar mici de metionină previne oxidarea proteinelor. În mod surprinzător, chiar și cantități mici de metionină sunt suficiente pentru a preveni oxidarea independent de concentrația de arginină.

Exemplul 2

Inventatorii prezenți au confirmat în continuare că prezenta formulare avantajoasă inventivă ar fi, de asemenea, adecvată pentru stabilizarea respectivei formulări recombinante de gonadotropină.

În acest scop, FSH recombinant și hCG recombinant (cu secvențele descrise mai sus, respectiv) au fost preparate în conformitate cu metode bine cunoscute.

A fost efectuat un studiu de stabilitate accelerată pentru două formulări, cuprinzând rhCG sau, respectiv, rFSH, așa cum este descris mai jos.

Efectul stabilizator surprinzător observat al argininei a fost confirmat și în proteinele recombinante. Ambele rFSH și rhCG au fost formulate în 5 mg / ml fenol, 0,15 mg / ml L-metionină, 150 mM arginină HCl, 0,005 mg / ml polisorbata 20, pH 6,8. Pentru a simplifica analiza stabilității proteinelor, rFSH și rhCG au fost formulate în recipiente diferite.

Tabelul 16:

	Imunoactivitate (UI/ml)				
	Inițial	1 lună, 30°C	2 luni, 30°C	4 luni, 30°C	16 luni, 5°C
FSH [33,3 μg/ml]	464	444	456	469	435
rhCG [50 μg/ml]	711	680	656	600	685
	SEC (Puritatea rFSH, %)				
	Inițial	1 lună, 30°C	2 luni, 30°C	4 luni, 30°C	16 luni, 5°C

	Imunoactivitate (UI/ml)				
	Inițial	1 lună, 30°C	2 luni, 30°C	4 luni, 30°C	16 luni, 5°C
FSH [33,3 µg/ml]	98,9 98,6).		98,3	97,9	96,9

	HIC (Puritatea rhCG, %)				
	Inițial	1 lună, 30°C	2 luni, 30°C	4 luni, 30°C	14 luni, 5°C
rhCG [50 µg/ml]	98,8	96,8	93,3	89,4	99,9

Acest lucru confirmă pe deplin că prezenta invenție cu formulare cu arginină, dar fără tampon suplimentar și cu o cantitate mică de metionină, este adecvată și pentru gonadotropinele recombinante stabilizate.

Exemplul 3

Au fost efectuate studii suplimentare, în care a fost evaluată următoarea compoziție:

Tabelul 17 Compoziția formulării lichide hMG 625 UI / ml

Lot nr.	Tampon ¹	Surfactant	Conservant	Antioxidant	Stabilizator/ Agent tonicitate
J-01	Fără tampon pH 6,8	0,005 mg/ml Polisorbat 20	5,0 mg/ml Fenol	0,15 mg/ml L- Metionină	150 mM L- arginină HCl

¹ pH este ajustat cu 0,2 N HCl/NaOH

10 Stabilitatea formulării țintă

Combinând toate rezultatele anterioare, stabilitatea bună a fost confirmată pentru formularea de mai sus, după cum urmează:

Tabelul 18 imunotestare FSH

Rezultatele stabilității imunotestului FSH în timpul depozitării timp de 3 luni la 25 ± 2°C/60 ± 5% umiditate relativă (HR) și 12 luni la 5 ± 3°C:						
Rezultatele imunotestului FSH în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR și 12 luni la 5 ± 3°C.						
FSH [% din inițial]		25°C ± 2°C/60 ± 5% RH			5°C ± 3°C	
Formulare	Inițial	1 lună	2 luni	3 luni	3 luni	12 luni
J-01	100	95,2	95,9	98,8	96,8	100,5
Rezultatele confirmă stabilitatea determinată prin imunotestare FSH.						

Tabelul 19 imunotestare hCG

Rezultatele stabilității imunotestului hCG în timpul depozitării timp de 1 lună la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR sunt listate în Tabelul 19 și 12 luni la 5 ± 3°C:						
Rezultatele imunotestului hCG în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR și 12 luni la 5 ± 3°C.						
hCG [% din inițial]		25°C ± 2°C/60 ± 5% RH			5°C ± 3°C	
Formulare	Inițial	1 lună			3 luni	12 luni
J-01	100	88,3			94,1	89,5

15

Rezultatele confirmă stabilitatea determinată prin imunotestare hCG.

Tabelul 20 Proteine oxidate

Rezultatele stabilității cantității de proteine oxidate [creștere % față de inițial] în timpul depozitării timp de 3 luni la 25 ± 2°C/60 ± 5% RH și 12 luni la 5 ± 3°C.						
Rezultatele proteinelor oxidate în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR și 12 luni la 5 ± 3°C.						
Proteine oxidate [% de creștere de la inițial]		25°C ± 2°C/60 ± 5% RH			5°C ± 3°C	
Formulare		1 lună	2 luni	3 luni	3 luni	12 luni
J-01		1,8	5,7	7,9	2,6	11

pH

Rezultatele stabilității de pH în timpul depozitării timp de 3 luni la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ HR și 12 luni la $5 \pm 3^\circ\text{C}$ prezent la pH stabil.

- 5 **Tabelul 21 Rezultatele pH-ului în timpul depozitării la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ HR și 12 luni la $5 \pm 3^\circ\text{C}$.**

pH		$25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ RH			$5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$	
Formulare	Inițial	1 luni	2 luni	3 luni	3 luni	12 luni
J-01	6,9	6,7	6,8	6,7	6,7	6,8

Exemplul 4

- 10 In plus față de cele de mai sus, inventatorii prezentei au efectuat, de asemenea, un studiu de bio-testare (stocare de 6 luni la 25°C pentru loturile DoE).

Test biologic FSH (Steelman-Pohley)

Rezultatele stabilității imunotestului FSH în timpul depozitării timp de 6 luni la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ HR sunt listate în Tabelul 22.

- 15 **Tabelul 22 Rezultatele biotestului FSH în timpul depozitării la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ HR. Descrierea completă a tuturor formulărilor este dată în Tabelul 11.**

FSH [% din potența declarată (600 UI/ml)]	$25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ RH
Formulare	6 luni
D-01	98,8
D-02	100,7
D-03	102,0
D-04	104,7
D-05	103,4
D-06	101,0
D-07	102,6
D-08	104,9

Rezultatele confirmă stabilitatea determinată prin biotestare FSH.

Bio-test LH (creșterea în greutate seminală)

- 20 Rezultatele stabilității biotestului LH în timpul depozitării timp de 6 luni la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ HR sunt listate în Tabelul 23.

Tabelul 23 Rezultatele biotestului LH în timpul depozitării la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ HR. Descrierea completă a tuturor formulărilor este dată în Tabelul 11.

LH [% din potența declarată (600 UI/ml)]	$25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ RH
Formulare	6 luni
D-01	87,8
D-02	101,3
D-03	90,9
D-04	95,6
D-05	97,5
D-06	95,0
D-07	97,3
D-08	100,1

Rezultatele confirmă stabilitatea determinată prin biotestare LH.

- 25 Mai mult, compoziția din Exemplul 3 a fost testată și într-un biotest FSH și LH, cu următoarele rezultate:

Rezultatele stabilității biotestului FSH în timpul depozitării timp de 3 luni la $25 \pm 2^\circ\text{C} / 60 \pm 5\%$ HR și 12 luni la $5 \pm 3^\circ\text{C}$ sunt listate în Tabelul 24:

- 30 **Tabelul 24: Rezultatele biotestului FSH în timpul depozitării la $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ HR și 12 luni la $5 \pm 3^\circ\text{C}$.**

FSH [% din potența declarată (625 UI/ml)]		25°C± 2°C/60 ± 5% RH			5°C± 3°C	
Formulare	Inițial	1 lună	2 luni	3 luni	3 luni	12 luni
J-01	94,7	93,6	94,5	97,6	95,8	96,1

Rezultatele confirmă stabilitatea determinată prin biotestare FSH.

Rezultatele stabilității biotestului LH în timpul depozitării timp de 3 luni la 25 ± 2°C/60 ± 5% RH și 12 luni la 5 ± 3°C sunt listate în Tabelul 25.

5 **Tabelul 25 Rezultatele biotestului LH în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% RH și 12 luni la 5 ± 3°C.**

LH [% din potența declarată (625 UI/ml)]		25°C± 2°C/60 ± 5% RH			5°C± 3°C	
Formulare	Inițial	1 lună	2 luni	3 luni	3 luni	12 luni
J-01	102,1	102,2	99,0	100,0	101,5	100,0

Rezultatele confirmă stabilitatea determinată prin biotestare LH.

8 Abrevieri și definiții

10

BP

Farmacopeea Britanică

DoE

Proiect de experiment

15

DS

Substanță medicamentoasă

FSH

Hormon de stimulare a foliculului

hCG

20

Gonadotropină corionică umană

hMG

Gonadotropina menopauzală umană

hMG-HP

Human menopausal gonadotropin-înalt purificată

25

JP

Farmacopeea Japoneză

LH

Hormon luteinizant

MD

30

Doză multiplă

NF

Formularul național

Ph Eur

Farmacopeea Europeană

35

PS 20

Polisorbat 20

USP

Farmacopeea Americană

WFI

40

Apă pentru injecție

LISTA DE SECVENȚE

- 5 <110> Ferring B.V.
 <120> FORMULARE DE GONADOTROPINĂ LICHIDĂ STABILĂ
 <130> HE183650
 <160> 4
 <170> BiSSAP 1.3
- 10 <210> 1
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
- 15 <221> SEMNAL
 <222> 1..24
 <223> peptidă lider
 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asp | Tyr | Tyr | Arg | Lys | Tyr | Ala | Ala | Ile | Phe | Leu | Val | Thr | Leu | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Val | Phe | Leu | His | Val | Leu | His | Ser | Ala | Pro | Asp | Val | Gln | Asp | Cys | Pro |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Glu | Cys | Thr | Leu | Gln | Glu | Asn | Pro | Phe | Phe | Ser | Gln | Pro | Gly | Ala | Pro |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ile | Leu | Gln | Cys | Met | Gly | Cys | Cys | Phe | Ser | Arg | Ala | Tyr | Pro | Thr | Pro |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Leu | Arg | Ser | Lys | Lys | Thr | Met | Leu | Val | Gln | Lys | Asn | Val | Thr | Ser | Glu |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Ser | Thr | Cys | Cys | Val | Ala | Lys | Ser | Tyr | Asn | Arg | Val | Thr | Val | Met | Gly |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Gly | Phe | Lys | Val | Glu | Asn | His | Thr | Ala | Cys | His | Cys | Ser | Thr | Cys | Tyr |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Tyr | His | Lys | Ser | | | | | | | | | | | | |
| | | | 115 | | | | | | | | | | | | |
- 20 <210> 2
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
- 25 <221> SEMNAL
 <222> 1..18
 <223> peptidă lider
 <400> 2
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | Thr | Leu | Gln | Phe | Phe | Phe | Leu | Phe | Cys | Cys | Trp | Lys | Ala | Ile |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Cys | Cys | Asn | Ser | Cys | Glu | Leu | Thr | Asn | Ile | Thr | Ile | Ala | Ile | Glu | Lys |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Glu | Glu | Cys | Arg | Phe | Cys | Ile | Ser | Ile | Asn | Thr | Thr | Trp | Cys | Ala | Gly |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Tyr | Cys | Tyr | Thr | Arg | Asp | Leu | Val | Tyr | Lys | Asp | Pro | Ala | Arg | Pro | Lys |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Ile | Gln | Lys | Thr | Cys | Thr | Phe | Lys | Glu | Leu | Val | Tyr | Glu | Thr | Val | Arg |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Val | Pro | Gly | Cys | Ala | His | His | Ala | Asp | Ser | Leu | Tyr | Thr | Tyr | Pro | Val |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
- 30 -
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Thr | Gln | Cys | His | Cys | Gly | Lys | Cys | Asp | Ser | Asp | Ser | Thr | Asp | Cys |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Thr | Val | Arg | Gly | Leu | Gly | Pro | Ser | Tyr | Cys | Ser | Phe | Gly | Glu | Met | Lys |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
- Glu
 <210> 3
 <211> 165
 <212> PRT
- 35 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> SEMNAL

<222> 1..20

<223> peptidă lider

<400> 3

```

Met Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly
1      5      10      15
Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile
20      25      30
Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr
35      40      45
Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Thr Arg Val
50      55      60
Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg
65      70      75      80
Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val
85      90      95
Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu
100     105     110
Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu
115     120     125
Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
130     135     140
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
145     150     155     160
Pro Ile Leu Pro Gln
165

```

5

<210> 4

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> SEMNAL

<222> 1..20

<223> peptidă lider

<400> 4

```

Met Glu Met Leu Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly
1      5      10      15
Gly Ala Trp Ala Ser Arg Glu Pro Leu Arg Pro Trp Cys His Pro Ile
20      25      30
Asn Ala Ile Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr
35      40      45
Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Met Arg Val
50      55      60
Leu Gln Ala Val Leu Pro Pro Leu Pro Gln Val Val Cys Thr Tyr Arg
65      70      75      80
Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val

```

15

-

```

85      90      95
Asp Pro Val Val Ser Phe Pro Val Ala Leu Ser Cys Arg Cys Gly Pro
100     105     110
Cys Arg Arg Ser Thr Ser Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu
115     120     125
Thr Cys Asp His Pro Gln Leu Ser Gly Leu Leu Phe Leu
130     135     140

```

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- EP-A1- 2 417 982
- EP-A2- 0 974 359
- WO-A1-2015/075743
- WO-A2-2011/099036
- US-A- 5 929 028

(57) Revendicări:

1. Formulare farmaceutică lichidă de gonadotropină, cuprinzând o gonadotropină, arginină într-o cantitate de la 50 la 160 mM și metionină într-o cantitate de la 0,05 la 1,5 mg / ml, în care formularea nu conține un tampon suplimentar și în care pH-ul formulării este cuprins între 6,0 și 7,5.

2. Formulare farmaceutică conform revendicării 1, în care gonadotropina cuprinde hCG (gonadotropină corionică umană) și opțional FSH și / sau LH.

3. Formulare farmaceutică conform revendicării 1 sau 2, în care gonadotropina cuprinde hMG (gonadotropină menopauzală umană).

4. Formulare farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, în care gonadotropina cuprinde origine umană a FSH, LH și / sau hCG derivate din urină.

5. Formulare farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, în care gonadotropina cuprinde FSH recombinant, LH și / sau hCG.

6. Formulare farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările precedente, care cuprinde suplimentar un conservant, de preferință fenol.

7. Formulare farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările precedente, care cuprinde suplimentar un agent activ de suprafață, de preferință un polisorbit, chiar mai preferabil polisorbit 20.

8. Formulare farmaceutică conform revendicării 6 sau 7, în care conservantul, preferabil fenolul, este cuprins într-o cantitate de 4 - 6 mg / ml, de preferință într-o cantitate de 5 mg / ml.

9. Formulare farmaceutică conform revendicării 7 sau 8, în care agentul activ de suprafață, de preferință polisorbitul 20, este cuprins într-o cantitate de 0,001 - 0,05 mg / ml, de preferință într-o cantitate de 0,005 mg / ml.

10. Formulare farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care arginina este preferabil L-arginină HCl.

11. Formulare farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care hMG este cuprins într-o cantitate de 300 - 900, preferabil 500 - 700, IU / ml.

12. Formulare farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările precedente, care constă din

- 625 IU/ml hMG
- 0,15 mg/ml metionină
- 150 mM arginină
- 5 mg/ml fenol
- 0,005 mg/ml polisorbit 20
- apă pentru injecție (WFI), și
- în care formularea are un pH de 6,8 +/- 0,3.

13. O formulare farmaceutică lichidă, așa cum este descrisă în oricare dintre revendicările precedente, pentru utilizare într-o metodă de tratament a infertilității.

14. Formulare farmaceutică pentru utilizarea din revendicarea 13, în care tratamentul este un tratament de inducție a ovulației (OI), tehnici de reproducere asistată (ART) și / sau hipogonadism hipogonadotrofic la bărbați.

15. Metodă pentru stabilizarea unei formulări farmaceutice lichide, cuprinzând hMG, care cuprinde etapa de

- Furnizarea unui eșantion de urină de la o femeie umană,
- Extragerea hMG din eșantion,
- Compunerea extractului menționat cu arginină și metionină, în cantități definite în oricare dintre revendicările precedente,
- Opțional adăugând suplimentar fenol și polisorbit în cantități definite în oricare dintre revendicările precedente,

- Reglarea pH-ului formulării între 6,0 și 7,5,
- în care nu se adaugă tampon suplimentar.

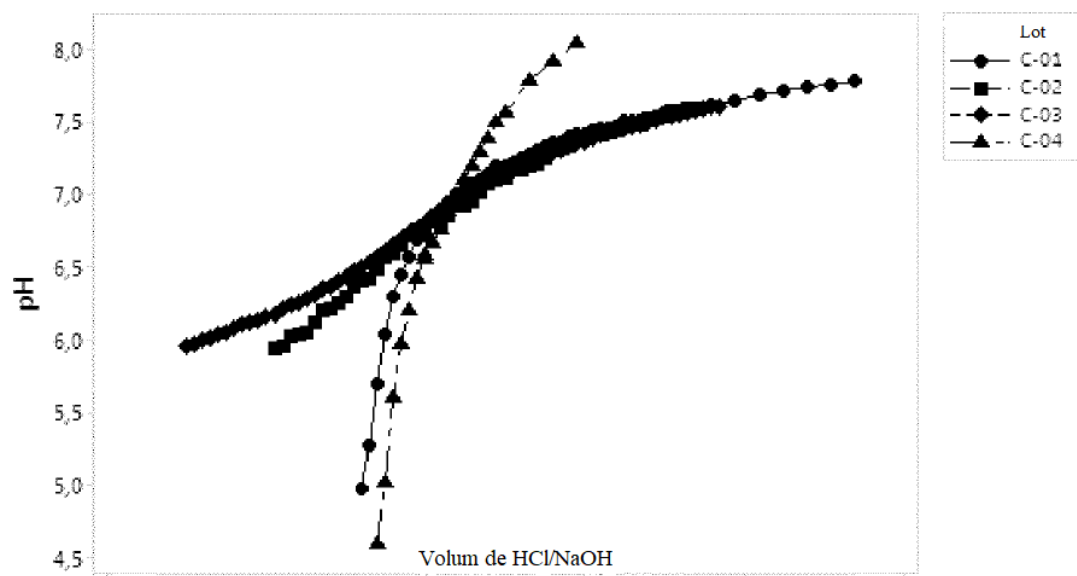


Fig. 1

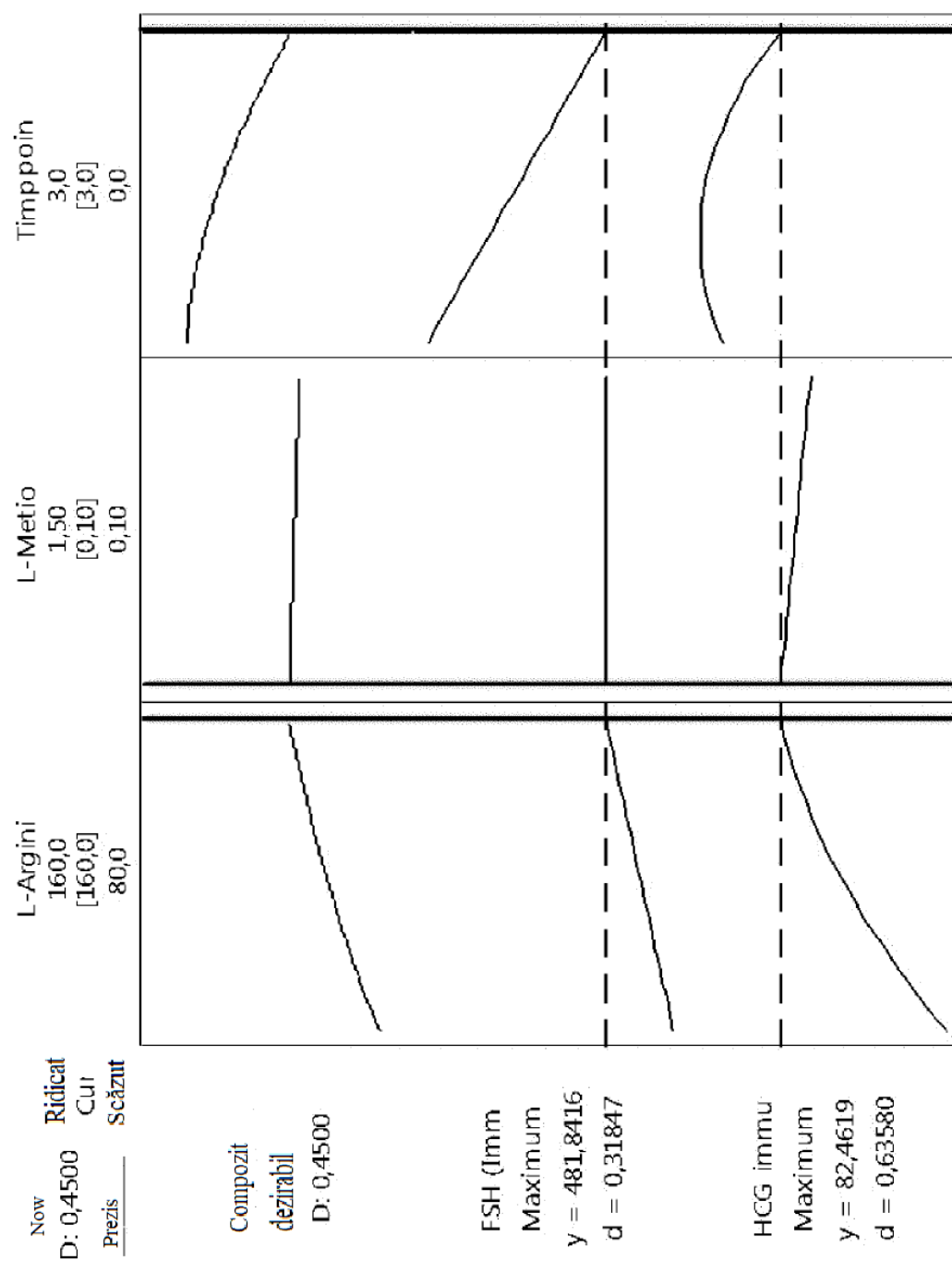


Fig. 2