MD/EP 3791860 T2 2024.03.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **MD/EP 3791860** (13) **T2**

(51) Int. Cl:***A61K 9/00*** (2006.01.01)
A61K 9/08 (2006.01.01)
A61K 47/18 (2017.01.01)
A61P 15/08 (2006.01.01)
A61K 38/24 (2006.01.01)
A61K 47/20 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENŢIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2021 0250

(22) Data de depozit: 2017.02.24

(96) Numărul cererii şi data de depozit a cererii de brevet european: 20202758.7, 2017.02.24

(97) Numărul de publicare şi data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3791860, 2021.03.17

(31) Numărul cererii prioritare: 201603280

(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.02.24

(33) Ţara cererii prioritare: GB

(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2024, 2024.03.31

(80) Data publicării menţiunii acordării de către OEB: EPB nr. 41/2023, 2023.10.11

(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 04/2021, 2021.04.30

(71) Solicitant: FERRING B.V., NL

(72) Inventatori: SJÖGREN Helen Ulrika, SE; HØJER-PEDERSEN Charlotte, DK

(73) Titular: FERRING B.V., NL

(74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela

MD/EP 3791860 T2 2024.03.31

(54) Formulare de gonadotropină lichidă stabilă

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenţie se referă în general la domeniul stabilizării formulărilor de gonadotropine, în special formulărilor lichide de gonadotropine. Stabilizarea este realizată printr-o combinaţie specială de excipienţi, de preferinţă arginină şi metionină. Într-o variantă

2

de realizare preferată, formularea nu cuprinde un tampon.

Revendicări: 14

Figuri: 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

2

combination of excipients, preferably arginine and methionine. In a preferred embodiment, the formulation does not comprise a buffer.

Claims: 14

Fig.: 2

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

DOMENIUL INVENŢIEI

Prezenta invenţie se referă în general la domeniul stabilizării formulărilor de gonadotropină, în special a formulărilor lichide de gonadotropine. Stabilizarea se realizează printr-o combinaţie particulară de excipienţi, şi anume arginină şi fără tampon suplimentar.

FONDUL INVENŢIEI

Gonadotropinele sunt o familie de hormoni, care sunt implicaţi în esenţă şi în principal în ciclul fertilităţii la femei şi bărbaţi. Gonadotropinele pot fi derivate din urină, atât în scopuri de cercetare, cât şi în scopuri de tratament, cu toate acestea, mai multe gonadotropine, cum ar fi hCG, LH şi FSH, pot fi, de asemenea, produse recombinant.

În special, gonadotropinele pot fi utilizate în tratamentul infertilităţii.

Cele patru gonadotropine principale aparţin toate aceleiaşi familii de glicoproteine. Acestea sunt hormonul foliculostimulant (FSH), hormonul stimulator al tiroidei (TSH), hormonul luteinizant (LH) şi gonadotropina (umană) corionică (hCG). Toate aceste gonadotropine sunt heterodimere şi constau dintr-o subunitate alfa şi beta; subunitatea alfa este comună tuturor, adică aceeaşi pentru toate cele patru gonadotropine menţionate mai sus, în timp ce subunitatea, respectiv beta diferă. Acţiunea FSH este mediată de un receptor FSH distinct. Lanţurile beta ale LH şi HCG împărtăşesc omologie de secvenţă proteică de 82% şi îşi exercită acţiunile prin acelaşi receptor LH.

FSH este secretat în mod natural de glanda pituitară anterioară şi funcţionează pentru a susţine dezvoltarea foliculară şi ovulaţia. FSH cuprinde o subunitate alfa de 92 de aminoacizi, comună celorlalţi hormoni glicoproteici, de ex. LH şi hCG şi o subunitate beta de 111 aminoacizi unică la FSH care conferă specificitatea biologică hormonului (Pierce şi 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 şi hCG este modificată post-translaţional prin adăugarea de reziduuri complexe de carbohidraţi. Pentru FSH, ambele subunităţi poartă două situsuri pentru ataşarea glicanului legat de N, subunitatea alfa la aminoacizii 52 şi 78 şi subunitatea beta la resturile de aminoacizi 7 şi 24 (Rathnam şi 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 şi 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 şi 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 conţine atât N- cât şi O-glicozilare (N-13, N-30, 0-121, 0-127, 0-132 şi 0-138). Glicozilarea suplimentară din subunitatea beta a hCG o face mai hidrofilă decât cea a FSH. Subunităţile ß oferă specificitate pentru interacţiunea receptorilor.

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

FSH urinar purificat şi menotropinele menopauzale umane (hMG), ambele izolate de urina femeilor aflate în postmenopauză, au fost utilizate de mai mulţi ani în tratamentul infertilităţii fie pentru a induce (mono) ovulaţia, fie pentru a stimula foliculi multipli la pacienţii supuşi stimulării ovariene controlate (COS) înainte de tehnologiile de reproducere asistată (ART). Două versiuni recombinante de FSH, Gonal-F® (folitropină alfa, Merck Serono) şi 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).

Celulele CHO sunt utilizate în mod obişnuit pentru producerea proteinelor recombinante farmaceutice. Analiza structurală a identificat faptul că acidul sialic este ataşat exclusiv printr-o legătură α2,3-. Multe glicoproteine umane conţin un amestec de legături α2,3- şi α2,6- pentru reziduurile de acid sialic. Prin urmare, proteinele recombinante exprimate utilizând 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, așa cum sunt definite în continuare in revendicări. 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: și

1. O formulare farmaceutică lichidă de gonadotropină, cuprinzând o gonadotropină și arginină într-o cantitate de la 50 la 160 mM, 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 polisorbat, chiar mai preferabil polisorbat 20.

8. Formulare 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.

9. Formularea farmaceutică de la punctul 7 sau 8, în care agentul activ de suprafață, de preferință polisorbatul 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 HCI.

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

13. Formulare farmaceutică pentru utilizare în articolul 12, în care tratamentul este un tratament de inducție a ovulației (OI), tehnici de reproducere asistată (ART) și/sau hipogonadism hipogonadotrofic la bărbați.

14. O metodă pentru stabilizarea unei formulări farmaceutice lichide, cuprinzând hMG, care cuprinde etapa de

o Furnizarea unei probe de urină de la o femelă umană

o Extragerea hMG

o Compunând extractul menționat cu arginină și metionină, în cantități definite în oricare dintre punctele precedente,

o Opțional adăugând suplimentar fenol și polisorbat 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,

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 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, 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)

(*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))

MDYYRKYAAIFLVTLSVFLHVLHSAPDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSRAYPTPLRSKKTMLVQKNV
TSESTCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYYHKS (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))

MKTLQFFFLFCCWKAICCNSCELTNITIAIEKEECRFCISINTTWCAGYCYTRDLVYKDPARPKIQKTCTFKELVYETVR
VPGCAHHADSLYTYPVATQCHCGKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFGEMKE (partea subliniată este peptida
lider) (129)

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 recitire în regiunea 3'-netradusă Natura. 14Aug 1980 ; 286(5774):684-7)

MEMFQGLLLLLLSMGGTWASKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV SYAVALSCQC ALCRRSTTDC GGPKDHPLTC DDPRFQDSSS SKAPPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQ (partea subliniată este peptida lider) (165)

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))

MEMLQGLLLLLLSMGGAWASREPLRPWCH PINAILAVEKEGCPVCITVN TTICAGYCPTMMRVLQAVLPPLPQVVCTYRDVRFESIRLPGCPRGVDPVVSFPVALSCRCGPCRRSTSDC GGPKDHPLTC DHPQLSGLLFL (partea subliniată este peptida lider) (141)

Într-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.

"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.

Un posibil produs poate fi o formulare care include FSH (într-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.

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.

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.

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.

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 în 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.

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

Într-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.

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, Polisorbat 20
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:

Pentru rFSH: 30 - 150 µg/ml
Pentru rhCG: 5 - 200 µg/ml

Excipienții preferați pentru astfel de formulări recombinate 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.

Formele de depozit injectabile pot fi realizate prin formarea de matrice microîncapsulate 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, micelii, 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 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 micele, lipozomi sau microemulsii care sunt compatibile cu țesuturile corpului.

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.

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. Într-o variantă preferată, compozițiile invenției sunt furnizate ca compoziții pentru administrare parenterală. Metodele generale pentru prepararea 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. Într-un exemplu de realizare preferat în special, compozițiile parenterale sunt furnizate sub formă de unitate de dozare pentru ușurința administrării 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.

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 endometrioză, de exemplu endometrioză 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 terapia cu menotropină.*
- *Femeile supuse superovulației în cadrul unui program de fertilizare asistat 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.

Într-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 plasture), 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, tampoane 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.

Deşi formulările de gonadotropină sunt pe piaţă de câteva decenii acum, omul de ştiinţă al formulării este foarte conştient de faptul că formularea acestor proteine este asociată cu o serie de dificultăţi. Aceste dificultăţi există şi 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 influenţată de selecţia specifică a fabricării şi a excipienţilor)

• Proteinele specifice formulate (chimia formulării variază semnificativ în funcţie de proteina reală: s-a demonstrat, de exemplu, că şi proteinele strâns legate, cum ar fi FSH şi hCG, se comportă diferit în aceeaşi formulare, vezi de exemplu WO 2012/013742)

• Dacă proteina a fost obţinută sau nu din natură, de ex. urină sau produsă recombinant

• Dacă este nevoie de un conservant (unii conservanţi îşi îndeplinesc obiectivul de protecţie împotriva creşterii microbiene, dar afectează negativ stabilitatea formulării finale. Acest lucru este valabil pentru toţi, m-crezolul, fenolul şi alcoolul benzilic (cu sau fără clorură de benzalconiu), care sunt în prezent singurii conservanţi autorizaţi pentru utilizare cu gonadotropine; în plus, conservanţii pot avea un efect negativ asupra colorării, în funcţie de excipienţii suplimentari şi de ingredientul activ cuprins în formulare)

• Agentul activ de suprafaţă specific utilizat (aceştia pot duce, în unele cazuri, la turbiditate, în funcţie din nou de excipienţii suplimentari incluşi într-o respectivă formulare)

• Tamponul specific utilizat (de ex., tamponul de citrat va duce frecvent la durere şi iritarea pielii la injectare)

• Excipienţii specifici folosiţi pentru stabilizare, care vor stabiliza diferite compoziţii în moduri imprevizibile.

• În funcţie de excipientul utilizat pentru stabilizare, care va stabiliza diferite compoziţii în moduri imprevizibile.

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

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

În acest sens, „fără (adăugarea de/suplimentar) tampon ” şi „nu cuprinde un tampon” este utilizat sinonim în această aplicaţie. Această expresie înseamnă că nu este adăugat / prezent în compoziţie nici un compus suplimentar care ar fi considerat a avea capacitate de tampon. Se spune că o soluţie este tamponată dacă rezistă schimbărilor în activitatea unui ion la adăugarea de substanţe care se aşteaptă să modifice activitatea acelui ion. Tampoanele sunt substanţe sau combinaţii de substanţe care conferă această rezistenţă unei soluţii. Soluţiile tamponate sunt sisteme în care ionul este în echilibru cu substanţe capabile să îndepărteze sau să elibereze ionul. Se referă la cantitatea de material care poate fi adăugată la o soluţie fără a provoca o schimbare semnificativă a activităţii ionilor. Este definit ca raportul dintre acid sau bază adăugată (în echivalenţi gram/l) la modificarea unităţilor de pH. Capacitatea unei soluţii tamponate este ajustată la condiţiile de utilizare, de obicei prin ajustarea concentraţiilor de substanţe tampon (USP NF). Capacitatea tamponului este exprimată în mod obişnuit ca numărul de echivalenţi (Eq) de acid puternic (de ex., HCI) sau de bază (de ex., NaOH) care determină un litru de soluţie în cauză să sufere o modificare a pH-ului cu o unitate (de preferinţă la o atmosferă şi 21°C) (Skoog West şi Holler, Fundamentals of Analytical Chemistry, ediţia a cincea). Un HCI echivalent este egal cu un mol HCI şi un NaOH echivalent este egal cu un mol NaOH. În prezenta invenţie, capacitatea tamponului va fi exprimată ca număr de echivalenţi (Eq) de acid puternic (de ex., HCI) sau bază (de ex., NaOH) care determină ca un litru de soluţie în cauză să sufere o schimbare a pH-ului cu o unitate. Astfel, în conformitate cu prezenta invenţie, formularea nu trebuie să cuprindă un tampon suplimentar, care să contribuie cu ≥0,5 mEq/(litru*pH) (de preferinţă la 1 atm, 21°C) în intervalul de pH descris pentru prezentele formulări din invenţie.

Metodă de determinare şi calculare a capacităţii tamponului

Capacitatea tamponului poate fi determinată şi calculată după cum urmează.

Un volum definit al soluţiei de testat este titrat cu acid de ex. HCI sau bază de ex. NaOH. Concentraţii adecvate de acid şi bază, de ex. 0,2 N trebuie utilizate pentru a realiza o titrare suficient de precisă.

Titrarea se realizează prin adăugarea unor mici alicote de HCI sau NaOH la soluţia de testare. Pentru fiecare adăugare se documentează volumul adăugat şi pH-ul corespunzător.

Volumul acumulat de acid şi bază este reprezentat grafic faţă 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.

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

Ecuația 1

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

în care:

x
= capacitate tampon [µL 0,2 N HCl/NaOH pentru a deplasa pH 1 pH unit]
Y-b
= 1 pH unități
a
= panta

și

Ecuația 2

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

În 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 egaal cu 200 mEq/l HCl/NaOH.

x = capacitatea tamponului [mEq/litru×pH unități]
Y-b = 1 pH unități
C = Concentrația de acid sau bază de ex. pentru

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

V = Volumul de soluție în cauză
10^6 factor de corecție de la µl la litru
Exemplu de calcul utilizând *Ecuația* 2 și lot C-01$_{\text{domeniu pH 6,564-6,947}}$, 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 ≥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 componentei date la capacitatea tamponului.

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 tampoane (care sunt tampoane aprobate de FDA pentru uz parenteral în intervalul de pH 6,0 - 7,5):

Histidină
Fosfat
Citrat
Trometamină (Tris)
Acid hidroxietilpiperazin etan sulfonic (HEPES)
Carbonat

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
Succinat
Asparagină
Acid aspartic
Glutamat (acid glutamic)
Glicină
Lactat
Lizină
Maleat (acid maleic)
Fumarat (acid fumaric)

Malat
Meglumină
Propionat
Alanină
Fenilalanină
Cisteină
Izoleucină
Leucină
Prolină
Serină
Tartrat
Treonină
Triptofan
Tirozină
Valină

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 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 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 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 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.

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 HCI sau chiar mai preferată, L-arginină (HCI). 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, într-un aspect de referință, 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. În acest aspect de referință,

cantitatea de metionină este cuprinsă între 0,1 şi 1,5 mg/ml. Într-un aspect de referinţă suplimentar, cantitatea de metionină este între 0,1 şi 1 mg/ml. Într-un aspect de referinţă suplimentar, cantitatea de metionină este cuprinsă între 0,1 şi 0,5 mg/ml. Un aspect de referinţă suplimentar are 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 şi depăşită de o cantitate atât de mică de metionină.

Chiar şi mai surprinzător a fost constatarea că arginina a avut un efect stabilizator mult mai pronunţat decât alţi agenţi stabilizatori cunoscuţi, de ex. zaharoza, care este un stabilizator adăugat destul de frecvent şi foarte bine stabilit.

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

Mai preferată, în special pentru formulările multidoză, în prezenta invenţie este adăugarea unui conservant. Foarte preferat acest conservant este fenolul. Într-o altă variantă preferată, fenolul este adăugat la o concentraţie de 4,0 până la 6,0 mg/ml, de preferinţă 5,0 mg/ml fenol. În mod surprinzător, fenolul este, de asemenea, avantajos în contextul formulării specifice prezente, comparativ cu alţi conservanţi bine cunoscuţi, prin faptul că nu duce la o colorare şi este foarte stabil, chiar şi pe o perioadă prelungită de timp, în ciuda prezenţei acestui conservant, aşa cum se arată în secţiunea de exemple.

Mai preferată în prezenta invenţie este adăugarea unui agent activ de suprafaţă. Foarte preferat acest agent activ de suprafaţă este un polisorbat, chiar mai preferat polisorbat 20. Într-o altă variantă preferată, polisorbatul 20 este adăugat la o concentraţie de 0,001 - 0,05 mg/ml, de preferinţă 0,005 mg/ml polisorbat 20. În mod avantajos, formularea acestei invenţii, compusă cu polisorbat 20, nu duce la turbiditate şi este foarte stabilă, chiar şi pe o perioadă prelungită de timp, în ciuda prezenţei acestui conservant, aşa cum se arată în secţiunea de exemple.

Compoziţiile pot conţine, de asemenea, aditivi suplimentari pe lângă cei deja enumeraţi mai sus, cum ar fi, dar fără a se limita la conservanţi (suplimentari), agenţi de umectare, agenţi de emulsionare şi agenţi de dispersare. Agenţii antibacterieni şi antifungici pot fi incluşi pentru a preveni creşterea microbilor şi includ, de exemplu, parabeni, clorobutanol, fenoli, acid sorbic şi altele asemenea. Mai mult, poate fi de dorit să se includă agenţi de tonicitate. Prezenta formulare inventivă totuşi **nu cuprinde un tampon suplimentar.**

În unele cazuri, pentru a efectua o acţiune prelungită, este de dorit să se încetinească absorbţia gonadotropinei(lor), cum ar fi FSH (şi alte ingrediente active, dacă sunt prezente) din injecţia 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 absorbţie depinde apoi de viteza de dizolvare care, la rândul său, poate depinde de mărimea cristalului şi de forma cristalină. Alternativ, absorbţia întârziată a unei forme combinate de FSH administrată parenteral se realizează prin dizolvarea sau suspendarea combinaţiei FSH într-un vehicul uleios.

Conform prezentei invenţii, inventatorii au făcut un efort pentru a investiga efectul anumitor compuşi asupra stabilităţii unei formulări lichide de gonadotropină; aici, s-au investigat efectele de stabilizatoare şi destabilizare ale mai multor compuşi. În plus, inventatorii au căutat să îmbunătăţească formularea rezultată în ceea ce priveşte claritatea, gradul de colorare şi durerea la injecţie.

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

În prezenta invenţie, termenul "stabilitate" se referă la bio-stabilitatea formulărilor de gonadotropine, în special FSH şi 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 conformaţională care reduce cel puţin o activitate biologică, de ex., proteine FSH (şi alte ingrediente active, dacă sunt prezente) incluse în prezenta invenţie.

O soluţie sau formulare "stabilă" este una în care gradul de, agregare, disociere, modificare conformaţională, pierderea activităţii biologice şi altele asemenea, a proteinelor din ele este controlat acceptabil şi nu creşte inacceptabil în timp. Stabilitatea poate fi evaluată prin metode binecunoscute în domeniu, inclusiv măsurarea dispersiei luminii unei probe, inspecţia vizuală a clarităţii şi/sau colorării, absorbanţei sau densităţii optice, determinări ale dimensiunii moleculare (de ex. prin cromatografie de excludere a mărimii sau fracţionarea fluxului de câmp), activitate biologică *in vitro* sau *in vivo* şi/sau prin calorimetrie cu scanare diferenţială (DSC).

Prezenta formulare este stabilă timp de 12 luni în condiţii de depozitare, de preferinţă 16 luni în condiţii de depozitare, chiar mai preferată timp de 24 de luni, chiar mai preferabil timp de 24 de luni în condiţii de depozitare plus 1 lună „în utilizare", adică la temperatura camerei. Stabilitatea la „condiţii de depozitare" se referă la depozitarea formulării într-un mediu răcit, de ex. la 5°C ± 3°C. "Temperatura camerei" în contextul prezent se referă la 30°C sau sub 30°C, preferabil 15 - 25°C, preferabil 18 - 25°C, cel mai preferat 25 ± 2°C.

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

RP-HPLC pentru oxidare

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

Test de fluorescenţă a enzimei legate (ELFA)

Imunoactivitatea FSH şi hCG a fost determinată printr-un imunotest sandwich efectuat folosind un instrument VIDAS® cu analizor automat (BioMérieux, Franţa) cu kituri VIDAS® corespunzătoare FSH şi 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 şi detectare UV la 210 nm.

Cromatografie de interacţiune hidrofobă (HIC)

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

Biotestare FSH şi LH

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

Alte metode pentru evaluarea stabilităţii sunt bine cunoscute în domeniu şi pot fi, de asemenea, utilizate în conformitate cu prezenta invenţie.

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

Se ştia că mai mulţi conservanţi au un efect destabilizator pronunţat asupra formulărilor de gonadotropină şi s-a constatat surprinzător că formularea inventivă descrisă, în special cuprinzând arginină şi metionină, dar nu tampon, a fost deosebit de stabilă - chiar şi pe o perioadă prelungită de timp şi chiar şi în prezenţa fenolului.

Formularea revendicată în prezenta conform revendicarea 1 are un efect stabilizator asupra unei formulări lichide de hMG care este într-o manieră avantajoasă şi surprinzătoare chiar mai pronunţată decât efectele stabilizatoare ale stabilizatorilor cunoscuţi, cum ar fi de ex. zaharoză. Efectul de stabilizare îmbunătăţit comparativ cu stabilizatorii cunoscuţi precum zaharoza este deosebit de surprinzător. Mai mult, destul de neaşteptate, efectele stabilizatoare ale combinaţiei inventive au fost pronunţate în ciuda absenţei unui tampon.

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

Se pare că desfăşurarea conformaţională a structurilor FSH terţiare şi secundare care apar la încălzire este o tranziţie în două stări (când agregarea proteinelor este limitată). Această desfăşurare poate fi independentă de disocierea subunităţii (modificări ale structurii cuaternare).

Mai mult, a devenit clar în stadiul tehnicii că FSH, conţinând un conservant precum alcoolul benzilic sau fenolul, unde aceşti conservanţi sunt necesari, de exemplu ca agenţi 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 şi formele deja denaturate au un nivel mai scăzut de structuri secundare decât formulările de FSH care nu conţin conservanţi.

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

LISTA FIGURILOR

Figura 1: Curba de titrare. Panta curbelor 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 şi L-metionină şi răspunsurile în imunotestul FSH şi hCG ca Y (în UI/ml). R^2_{HCG}: 92,15% şi R^2_{FSH}: 67,31%.

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

EXEMPLE

Exemplul 1

1 Context şi introducere

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

FSH, LH şi gonadotropina corionică umană (hCG) aparţin familiei gonadotropinelor de hormoni glicoproteici complecşi. Sunt heterodimeri compuşi dintr-o subunitate α- şi β. Subunitatea α de 92 aminoacizi este comună pentru aceste trei gonadotropine, subunităţile β sunt unice, oferindu-le caracteristicile lor biologice diferite (Wolfenson C. şi 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., şi 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., şi 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., şi Combarnous, Y. 2001, Conformational stability and in vitro bioactivity of porcine luteinizing hormone. Mol. Cell Endocrinol. 176:129-134. Hormonii glicoproteici îşi pierd toţi bioactivitatea la disocierea subunităţilor 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 şi hCG se leagă de acelaşi receptor şi, prin urmare, ambii posedă activitate LH. În hMG activitatea LH provine în principal din hCG

Scopul prezentei invenţii este de a dezvolta o formulare de gonadotropină ca formulare lichidă, pentru injecţie subcutanată. Pentru injecţia multidoză, este de obicei necesară adăugarea unui conservant (Meyer, B. K., Ni, A., Hu, B. şi Shi, L. 2007, Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present. J. Pharm. Sci. 96:3155-3167; Chang, B. S. şi Hershenson, S. Practical Approaches to Protein Formulation Development. In Rational Design of Stable Protein Formulations. Editori J. F. Carpenter şi 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. compoziţia formulării, containerul/sistemele de închidere, pH-ul şi temperatura, fiind o faptă dificilă identificarea unei formulări lichide adecvate pentru gonadotropine, au fost selectaţi diferiţi excipienţi. În lucrarea de faţă, capacitatea tamponului şi 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 şi pH aşa cum este descris mai jos în detaliu.

2 Produs de studiat

2.1 Materiale

2.1.1 Substanţa medicamentoasă (DS)

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

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

2.1.2 Excipienţi

O listă a excipienţilor utilizaţi 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

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

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 ± 2°C/65 ± 5% RH și/sau pentru până la minimum 6 luni la 25 ± 2°C/60 ± 5% 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 acelui ion. Tampoanele 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 × 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/HCI 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/HCI și s-a documentat volumul de 0,2 N NaOH/HCI. Cantitatea de NaOH 0,2 N/HCI 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 µl HCI 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 × 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/ Agent tonicitate
E-01	10 mM fosfat[1] pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	3,0 mg/ml M-crezol	41,3 mg/ml manitol
E-02	10 mM fosfat[1] pH 6,8	0,005 mg/ml polisorbat 20	3,0 mg/ml M-crezol	85,9 mg/ml trehaloză
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

Lot nr.	Tampon	Surfactant	Conservant	Stabilizator/ Agent tonicitate
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 excipienţi la soluţie, de ex. săruri, carbohidraţi sau aminoacizi, dar gradul de stabilizare la adăugarea diferiţilor carbohidraţi, săruri şi aminoacizi variază masiv între diferite formulări. Aici, studiile iniţiale de stabilitate au fost efectuate pentru a selecta diferiţi stabilizatori în combinaţie cu conservanţi şi tampoane într-o formulare lichidă de hMG. În mod surprinzător, rezultatele arată un efect stabilizator superior al L-argininei, aşa cum se arată în Tabelele 3 şi 6 pentru imunotestul hCG şi în Tabelele 4 şi 7 pentru imunotestul FSH.

Formularea E-09 prezintă o stabilitate superioară comparativ cu toate celelalte formulări. Formularea E-09 este singura formulare care conţine L-arginină (vezi Tabelul 2). Formularea K-01, K-03 şi K-04, precum şi K-09 prezintă stabilitate superioară comparativ cu toate celelalte formulări (vezi Tabelul 6). Aceste formulări conţin din nou L-arginină (vezi Tabelul 5). În Tabelul 4, formularea E-09 excelează cu cea mai bună stabilitate în comparaţie cu toate celelalte formulări, de asemenea, pentru imunotestarea FSH şi 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 ± 2°C/65 ± 5% HR. Formularea E-09 prezintă stabilitate superioară comparativ cu toate celelalte formulări. Formularea E-09 conţine L-arginină, vezi Tabelul 2.**

hCG [% din iniţial]		30°C ± 2°C/65 ± 5% RH	
Formulare	Iniţial	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	84	87
E-13	100	99	86
E-14	-	-	-
E-15	-	-	-

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

Tabelul 4 Imunotestarea FSH după 3 luni de stocare la 30 ± 2°C/65 ± 5% 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°C ± 2°C/65 ± 5% HR.	
Formulare	Inițial	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	96
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.

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
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

Lot nr.	Tampon	Surfactant	Conservant	Antioxidant	Stabilizator/ Agent tonicitate
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

Tabelul 6 **Imunotestare hCG în timp de 3 luni de stocare la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR 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	108

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.

Tabelul 7 **Imunotestarea FSH timp de 3 luni de stocare la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR**
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	130	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	130	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

Agenți tampon de ex. fosfatul de sodiu și citratul de sodiu sunt tampoane 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_2SO_4 x 10 H_2O (14 mg/ml sulfat de sodiu)

1 citrat de tri-sodiu dihidrat
2 0,8 mM Na_2HPO_4 × 12 H_2O și aprox. 0,2 mM H_3PO_4 până la pH 6,5
3 Referință placebo
4 Egal la 25,3 mg/ml L-arginină HCl

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 ± 0,3 pentru hMG, toate formulările hMG C-01 (fără tampon), C-02 (5 mM

citrat de sodiu dihidrat) şi C-03 (10 mM citrat tri-sodic dihidrat) au tampon similar şi o capacitate tampon mai mare decât formularea de referinţă conţinând 1 mM hidrogen fosfat di-sodic dodecahidrat. pH-ul ţintă pentru formularea de referinţă este de 6,5. Formularea C-01, C-02 şi -03 sunt comparate cu referinţa despre care se ştie că are un pH stabil. Numeroase studii de stabilitate ale formulării de referinţă C-04 au fost efectuate fără nicio derivare observată a pH-ului.

Următorul Tabel 9 prezintă rezultatele studiului capacităţii tamponului:

Tabelul 9 Studiul capacităţii 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 referinţă.

Lot	**Tampon**	**Capacitatea tamponului în jurul unui pH ţintă**	**domeniul pH-ului**	***a* (panta)**	**Capacitate tampon exprimată ca: mEq acid sau bază / (litru × unitate pH)**
C-01	Fără tampon	6,8	6,564 - 6,947	0,00150 7).	1,32
C-01	Fără tampon	7,0	6,786 - 7,193	0,00082 2).	2,44
C-02	5 mM citrat tri-sodic dihidrat	6,8	6,599 - 6,951	0,00067 2).	2,96
C-03	10 mM citrat tri-sodic dihidrat	6,8	6,572 - 6,946	0,00075 0).	2,66
C-04 (referinţă)	1 mM Hidrogen fosfat di-sodic dodecahidrat	6,5	6,199 - 6,752	0,00270 0).	0,74
C-04 (referinţă)	1 mM Hidrogen fosfat di-sodic dodecahidrat	6,8	6,582 - 6,982	0,00209 1).	0,96
(C-01 şi C-04 sunt menţionate de două ori, deoarece capacitatea tamponului a fost calculată în intervale de pH în jurul a două valori de pH diferite, respectiv)					

În mod surprinzător, capacitatea tamponului formulării hMG fără tampon (C-01) este mai mare decât formularea de referinţă C-04. Componenta principală a excipientului în formularea hMG este L-arginina la o concentraţie de 120 mM. Valorile pKa pentru L-arginină sunt pKa_1 = 2,17; pKa_2 = 9,04 şi pKa_3 = 12,5 (Handbook of Pharmaceutical Excipients. 2015, Pharmaceutical Press, Londra). Este foarte neaşteptat că arginina prezintă un comportament de tamponare suficient de departe de valorile pKa.

6.4 Studii de oxidare

După 3 luni de depozitare la 30 ± 2°C/65 ± 5% HR, formularea E-09 conţinând L-arginină (vezi Tabelul 5) a crescut nivelul proteinelor oxidate cu 241% din valoarea iniţială (vezi tabelul 10 de mai jos). Aceasta este o cantitate foarte mare şi există cazuri în care cantităţi atât de mari de oxidare nu sunt de dorit.

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

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

Tabelul 10 **Proteine oxidate în % crescute de la stocarea inițială timp de 3 luni la 30 ± 2°C/65 ± 5% HR**
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 intial]	30°C± 2°C/65 ± 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)	33

(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.

6.5 Studiu de stabilitate DoE

Combinând 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-	10 mM citrat[1]	0,1 mg/ml	5,0 mg/ml fenol	1,5 mg/L-	120 mM L-arginină

Lot nr.	Tampon[2]	Surfactant	Conservant	Antioxidant	Stabilizator/agent de izotonicitate
08[3]	pH 6,8	poloxamer 188		metionină	HCl
[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.

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 lunI**	**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

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

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 lunI**	**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

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 arginina 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.

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 ± 2°C/60 ± 5% HR și 3 luni la 30 ± 2°C/65 ± 5% HR 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 ± 2°C/60 ± 5% HR și 30 ± 2°C/65 ± 5% HR. Descrierea completă a tuturor formulărilor este dată în Tabelul 11.

Proteine oxidate [% de creștere de la inițial]	**30°C± 2°C/65 ± 5% RH**			**25°C± 2°C/60 ± 5% RH**			
Formulare	**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 aldine 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 stabiliza 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 ± 2°C/60 ± 5% HR și 3 luni la 30 ± 2°C/65 ± 5% HR. 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°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-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
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 decât 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 pKa_1 = 2,17; pKa_2 = 9,04 și pKa_3 = 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 ± 2°C/60 ± 5% HR și 3 luni de depozitare la 30 ± 2°C/65 ± 5% 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 ± 2°C/60 ± 5% HR și 3 luni de depozitare la 30 ± 2°C/65 ± 5% 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 polisorbat 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, %)				

	Imunoactivitate (UI/ml)				
	Iniţial	1 lună, 30°C	2 luni, 30°C	4 luni, 30°C	16 luni, 5°C
	Iniţial	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, %)				
	Iniţial	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 invenţie cu formulare cu arginină, dar fără tampon suplimentar şi cu o cantitate mică de metionină, este adecvată şi pentru gonadotropinele recombinante stabilizate.

Exemplul 3

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

Tabelul 17 Compoziţia 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					

Stabilitatea formulării ţintă

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

Tabelul 18 imunotestare FSH

Rezultatele stabilităţii imunotestului FSH în timpul depozitării timp de 3 luni la 25 ± 2°C/60 ± 5% umiditate relativă (HR) şi 12 luni la 5 ± 3°C:						
Rezultatele imunotestului FSH în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR şi 12 luni la 5 ± 3°C.						
FSH [% din iniţial]		**25°C± 2°C/60 ± 5% RH**			**5°C± 3°C**	
Formulare	**Iniţial**	**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 stabilităţii imunotestului hCG în timpul depozitării timp de 1 lună la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR sunt listate în Tabelul 19 şi 12 luni la 5 ± 3°C:				
Rezultatele imunotestului hCG în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR şi 12 luni la 5 ± 3°C.				
hCG [% din iniţial]		**25°C± 2°C/60 ± 5% RH**	**5°C± 3°C**	
Formulare	**Iniţial**	**1 lună**	**3 luni**	**12 luni**
J-01	100	88,3	94,1	89,5

Rezultatele confirmă stabilitatea determinată prin imunotestare hCG.

Tabelul 20 Proteine oxidate

Rezultatele stabilităţii cantităţii de proteine oxidate [creştere % faţă de iniţial] în timpul depozitării timp de 3 luni la 25 ± 2°C/60 ± 5% RH şi 12 luni la 5 ± 3°C.

Rezultatele proteinelor oxidate în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR şi 12 luni la 5 ± 3°C.					
Proteine oxidate [% de creştere de la iniţial]	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 stabilităţii de pH în timpul depozitării timp de 3 luni la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR şi 12 luni la 5 ± 3°C prezent la pH stabil.

Tabelul 21 Rezultatele pH-ului în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR şi 12 luni la 5 ± 3°C.

pH		25°C± 2°C/60 ± 5% RH			5°C± 3°C	
Formulare	Iniţial	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

În plus faţă de cele de mai sus, inventatorii prezentei au efectuat, de asemenea, un studiu de biotestare (stocare de 6 luni la 25°C pentru loturile DoE).

Test biologic FSH (Steelman-Pohley)

Rezultatele stabilităţii imunotestului FSH în timpul depozitării timp de 6 luni la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR sunt listate în Tabelul 22.

Tabelul 22 Rezultatele biotestului FSH în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR. Descrierea completă a tuturor formulărilor este dată în Tabelul 11.

FSH [% din potenţa declarată (600 UI/ml)]	25°C± 2°C/60 ± 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 (creşterea în greutate seminală)

Rezultatele stabilităţii biotestului LH în timpul depozitării timp de 6 luni la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR sunt listate în Tabelul 23.

Tabelul 23 Rezultatele biotestului LH în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR. Descrierea completă a tuturor formulărilor este dată în Tabelul 11.

LH [% din potenţa declarată (600 UI/ml)]	25°C± 2°C/60 ± 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

LH [% din potența declarată (600 UI/ml)]	25°C± 2°C/60 ± 5% RH
Formulare	**6 luni**
D-06	95,0
D-07	97,3
D-08	100,1

Rezultatele confirmă stabilitatea determinată prin biotestare LH.

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 ± 2°C / 60 ± 5% HR și 12 luni la 5 ± 3°C sunt listate în Tabelul 24:

Tabelul 24: Rezultatele biotestului FSH în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR și 12 luni la 5 ± 3°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.

Tabelul 25 Rezultatele biotestului LH în timpul depozitării la 25 ± 2°C/60 ± 5% HR 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

BP Farmacopeea Britanică
DoE Proiect de experiment
DS Substanță medicamentoasă
FSH Hormon de stimulare a foliculului
hCG Gonadotropină corionică umană
hMG Gonadotropina menopauzală umană
hMG-HP Human menopausal gonadotropin-înalt purificată
JP Farmacopeea Japoneză
LH Hormon luteinizant
MD Doză multiplă
NF Formularul național
Ph Eur Farmacopeea Europeană
PS 20 Polisorbat 20
USP Farmacopeea Americană
WFI Apă pentru injecție

(56) Referinţe 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, şi arginină într-o cantitate de la 50 la 160 mM, în care formularea nu conţine un tampon suplimentar şi în care pH-ul formulării este cuprins între 6,0 şi 7,5.

2. Formulare farmaceutică conform revendicării 1, în care gonadotropina cuprinde hCG (gonadotropină corionică umană) şi opţional FSH şi/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 şi/sau hCG derivate din urină.

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

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

7. Formulare farmaceutică conform oricăreia dintre revendicările precedente, care cuprinde suplimentar un agent activ de suprafaţă, de preferinţă un polisorbat, chiar mai preferabil polisorbat 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 preferinţă într-o cantitate de 5 mg/ml.

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

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

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

13. Formulare farmaceutică pentru utilizarea din revendicarea 12, în care tratamentul este un tratament de inducţie a ovulaţiei (OI), tehnici de reproducere asistată (ART) şi/sau hipogonadism hipogonadotrofic la bărbaţi.

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

- Furnizarea unui eşantion de urină de la o femeie umană,
- Extragerea hMG din eşantion,
- Compunerea extractului menţionat cu arginină şi metionină, în cantităţi definite în oricare dintre revendicările precedente,
- Opţional adăugând suplimentar fenol şi polisorbat în cantităţi definite în oricare dintre revendicările precedente,
- Reglarea pH-ului formulării între 6,0 şi 7,5,
- în care nu se adaugă tampon suplimentar.

FIGURA 1

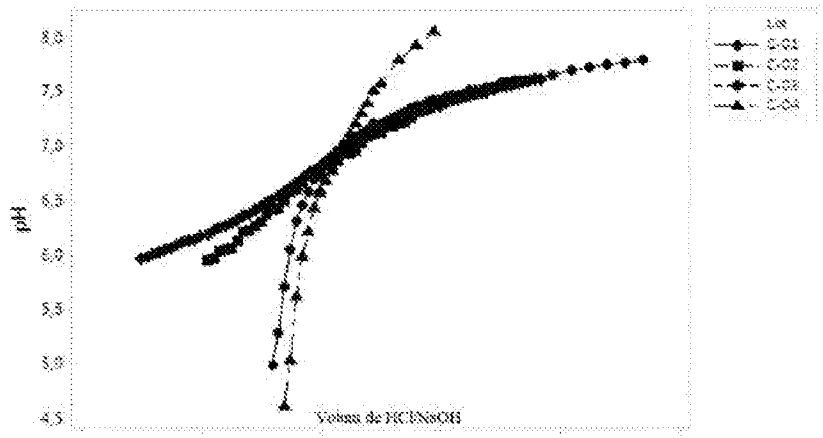


Figura 2

