



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 627**

51 Int. Cl.:
A61J 1/00 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02715376 .6**
86 Fecha de presentación : **17.01.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1359881**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2003**

54 Título: **Envase con bajo contenido de oxígeno que contiene FF-MAS.**

30 Prioridad: **06.02.2001 DK 2001 00189**
08.03.2001 DK 2001 00382

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

73 Titular/es: **NOVO NORDISK A/S**
Novo Alle
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es: **Müller, Lars, Klingberg y**
Andersen, Tina, Meinertz

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

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

DESCRIPCIÓN

Envase con bajo contenido de oxígeno que contiene FF-MAS.

5 La presente invención se refiere a una composición sólida, químicamente estable que puede ser usada en relación con la fertilización *in vitro* o maduración *in vitro* (de ahora en adelante designadas IVF o IVM, respectivamente). Más específicamente, se refiere a un recipiente que contiene tal composición sólida, tal y como se define en la reivindicación 1.

10 **Antecedentes de esta invención**

Diferentes sustancias de activación de la meiosis, p. ej. 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol, son conocidas p. ej. de WO-A-98/28323. Cuando el 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol es mantenido en un medio que contiene ovocitos, los ovocitos se hacen más propenso a la fertilización. No obstante, un problema principal que surge con el uso de 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol es que tiene una solubilidad muy baja y una estabilidad química baja según las condiciones en las que deba ser almacenado y usado.

20 El objetivo de esta invención es superar o mejorar al menos algunas de las desventajas del estado de la técnica anterior. Por lo tanto, no todos los objetos descritos más abajo detallados pueden ser completamente superados o mejorados.

Un objeto de esta invención es desarrollar una composición conteniendo 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol o un derivado que pueda ser disuelto en un medio acuoso en una concentración suficiente para ser usado para IVF o IVM.

25 Otro objeto es desarrollar una composición conteniendo 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol o un derivado que pueda ser disuelto en un medio acuoso sin ninguna influencia física tal como calentamiento, agitación, o tratamiento por ultrasonidos.

30 Un tercer objeto es desarrollar una composición conteniendo 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol o un derivado que tenga una estabilidad física y química suficiente en las condiciones bajo las cuales sea almacenada y usada.

35 La solubilidad de 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol (aquí designado FF-MAS), en agua es muy baja, es decir, aproximadamente 20 picogramos/ml (correspondiente a 2×10^{-5} μ g/ml). En etanol, la solubilidad de FF-MAS es sustancialmente más alta, es decir, aproximadamente 12 mg/ml. Según nuestras investigaciones preliminares, la solubilidad máxima de FF-MAS en una mezcla de etanol y agua (1:2.5) es aproximadamente 0,4 mg/ml. Otras sustancias distintas de activación de la meiosis (designadas aquí MAS) tienen una solubilidad baja similar en agua.

40 **Descripción detallada de esta invención**

Sorprendentemente, se ha descubierto que la estabilidad del 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol puede ser mejorada cuando es almacenado en presencia de sólo una pequeña cantidad de oxígeno. Por lo tanto, una forma de realización de esta invención se refiere a un recipiente cerrado que tiene un contenido bajo de oxígeno y que contiene además 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol. Esta invención se refiere a un recipiente cerrado, donde el contenido bajo de oxígeno está por debajo de aproximadamente 0,01 mol de oxígeno por litro de volumen del recipiente, preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,001 mol de oxígeno por litro de volumen del recipiente, incluso más preferido por debajo de aproximadamente 0,0001 mol de oxígeno por litro de volumen del recipiente.

45 Además, se acaba de descubrir sorprendentemente que una composición sólida conteniendo 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol y un aditivo tiene una buena solubilidad en agua. Los aditivos son componentes que, añadidos al 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol proporcionan una composición que puede ser usada para preparar una solución acuosa conteniendo 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol donde la concentración de MAS es suficientemente alta, preferiblemente aproximadamente por encima de 0,001 μ g/ml.

55 Por lo tanto, otra forma de realización de esta invención se refiere a un recipiente cerrado que tiene un contenido bajo de oxígeno y además contiene una composición sólida con alta solubilidad en agua comprendiendo 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol y un aditivo. Según una forma de realización preferida, esta invención se refiere a un recipiente cerrado conteniendo una atmósfera que tiene un contenido bajo de oxígeno y además contiene una composición sólida con alta solubilidad en agua comprendiendo 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol y un aditivo.

60 Según otra forma de realización, esta invención se refiere a un recipiente, donde el contenido de oxígeno en la atmósfera está por debajo de aproximadamente 10%, preferiblemente por debajo de aproximadamente 5%, más preferido por debajo de aproximadamente 1% (volumen/volumen). Según otra forma más de realización, esta invención se refiere a un recipiente, donde una parte sustancial de la atmósfera es nitrógeno o argón. Según otra forma más de realización, esta invención se refiere a un recipiente, donde el contenido de nitrógeno o argón en la atmósfera está aproximadamente por encima de 90%, preferiblemente aproximadamente por encima de 95%, más preferido aproximadamente por encima de 99% (volumen/volumen).

ES 2 301 627 T3

Ejemplos de aditivos preferidos son proteínas hidrosolubles tales como albúmina de suero, p. ej., albúmina de suero humano (designado HSA de ahora en adelante), opcionalmente en forma recombinante, enzimas y fosfoglicéridos tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidicolina, fosfatidilserina, y fosfatidilinositol. Como conocerán los expertos en la materia, la albúmina puede, por ejemplo, ser obtenida de suero o por ingeniería genética (recombinante) y, consecuentemente, los productos preparados pueden ser designados albúmina de suero o albúmina recombinante, respectivamente.

Según una forma de realización, esta invención se refiere a un recipiente, donde el aditivo es una proteína o un fosfoglicérido, preferiblemente albúmina de suero, más preferiblemente albúmina de suero humano, opcionalmente en forma recombinante. Según otra forma de realización, esta invención se refiere a un recipiente, donde el aditivo es albúmina de suero, opcionalmente en forma recombinante. Según otra forma más de realización, esta invención se refiere a un recipiente, donde el aditivo es albúmina de suero humano, opcionalmente en forma recombinante. Según otra forma más de realización, esta invención se refiere a un recipiente, donde el contenido de aditivo en las composiciones sólidas está aproximadamente por encima de 90%, preferiblemente aproximadamente por encima de 95%, incluso más preferido aproximadamente por encima de 98%, y más preferido aproximadamente por encima de 99%.

Preferiblemente, las composiciones sólidas tienen un contenido de agua por debajo de aproximadamente 10%, preferiblemente por debajo de aproximadamente 5%, más preferido por debajo de aproximadamente 1% (peso/peso). Según una forma de realización preferida, esta invención se refiere a un recipiente, donde el contenido de agua en la composición sólida está por debajo de aproximadamente 10%, preferiblemente por debajo de aproximadamente 5%, más preferido por debajo de aproximadamente 1% (peso/peso).

Preferiblemente, las composiciones sólidas tienen un contenido de solvente orgánico por debajo de aproximadamente 10%, preferiblemente por debajo de aproximadamente 5%, más preferido por debajo de aproximadamente 1% (peso/peso). Según una forma de realización preferida, esta invención se refiere a un recipiente, donde el contenido de solvente orgánico en la composición sólida está por debajo de aproximadamente 10%, preferiblemente por debajo de aproximadamente 5%, más preferido por debajo de aproximadamente 1%.

Preferiblemente, las composiciones sólidas tienen un contenido de 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol por debajo de aproximadamente 1%, preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,1%, más preferido por debajo de aproximadamente 0,05% (peso/peso). Según una forma de realización preferida, esta invención se refiere a un recipiente, donde el contenido de 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol en la composición sólida está por debajo de aproximadamente 10%, preferiblemente por debajo de aproximadamente 5%, más preferido por debajo de aproximadamente 2%, mucho más preferido por debajo de aproximadamente 1% (peso/peso).

Preferiblemente, las composiciones sólidas tienen un contenido de aditivo aproximadamente por encima de 50%, preferiblemente aproximadamente por encima de 80%, incluso más preferido aproximadamente por encima de 99%, y más preferido aproximadamente por encima de 99,9%.

Preferiblemente la proporción en peso entre 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol y el aditivo estará en el intervalo de aproximadamente 1:10, preferiblemente de aproximadamente 1:50, hasta aproximadamente 1:5,000. Un intervalo preferido es aproximadamente 1:1000.

Las composiciones sólidas preferidas son aquellas que pueden ser tratadas con un medio acuoso conteniendo ninguna o sólo concentraciones bajas de solvente orgánico dando como resultado una solución con una concentración suficientemente alta de 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol p. ej., aproximadamente por encima de 0,001 μ g/ml, preferiblemente aproximadamente por encima de 1 μ g/ml. Preferiblemente, estos medios acuosos contienen por debajo de aproximadamente 1%, preferiblemente por debajo de aproximadamente 0.5%, más preferido por debajo de aproximadamente 0,1% de solvente orgánico (peso/peso). Los diferentes intentos anteriores de preparar composiciones que cumplan este requisito han fracasado.

Generalmente, la composición sólida es preparada de una manera conocida *per se*.

Una manera de preparar las composiciones sólidas es preparar una solución de MAS en un solvente orgánico tal como etanol y, luego, preparar una solución acuosa del aditivo. Luego, las dos soluciones son mezcladas. Después de mezclar las dos soluciones, el solvente es evaporado o dejado evaporar. La evaporación puede ser acelerada usando corriente de aire continua sobre las soluciones mezcladas, secado al vacío, liofilización o cualquier otro método realizable generalmente conocido para eliminar el solvente. Preferiblemente, todas estas fases del proceso son realizadas en ausencia de oxígeno o en presencia de sólo una pequeña cantidad de oxígeno. De forma similar, la composición sólida final es mantenida en una atmósfera que contiene nada o sólo una cantidad pequeña de oxígeno. Una forma preferida de hacer esto es almacenar la composición sólida en un recipiente cerrado donde la atmósfera tenga un contenido bajo de oxígeno, p. ej., en nitrógeno o argón. Estos recipientes pueden ser recipientes de vidrio o recipientes de plástico que no tengan una acción indeseada con la composición sólida. Ejemplos preferidos de tales recipientes son viales tapados, ampollas, viales de discos sellados para tratamiento IVF o IVM u otros recipientes sellados. Otra forma preferida de evitar el contacto con oxígeno es almacenar la composición sólida en un recipiente cerrado al vacío. Por ejemplo, los recipientes pueden ser sellados al final del procedimiento de liofilización.

ES 2 301 627 T3

Los recipientes de esta invención son llenados con la atmósfera y la composición sólida mencionada en las reivindicaciones abajo de una manera conocida *per se*. De forma alternativa, hay vacío en los recipientes de esta invención.

5 El recipiente cerrado que tiene un contenido bajo de oxígeno y además contiene una composición sólida comprendiendo 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol y un aditivo puede ser preparado preparando una composición sólida comprendiendo MAS y un aditivo por liofilización y cerrando el recipiente al vacío.

10 El recipiente cerrado conteniendo una atmósfera que tiene un contenido bajo de oxígeno y que contiene además una composición sólida comprendiendo MAS y un aditivo puede ser preparado preparando una composición sólida comprendiendo MAS y un aditivo, llenando la composición sólida en un recipiente, llenando el recipiente con una atmósfera con un contenido bajo de oxígeno y cerrando el recipiente.

15 El proceso de preparación del recipiente de esta invención puede ser realizado bajo condiciones en las que haya una concentración baja de oxígeno, preferiblemente en una atmósfera que tenga un contenido bajo de oxígeno. De forma alternativa, el proceso puede ser realizado en condiciones en las que la preparación de la composición sólida comprendiendo MAS y un aditivo es realizado al vacío.

20 El producto comercializado podría ser una sistema de administración que tenga unas o más depresiones o huecos. De ahora en adelante, estas depresiones y huecos son mutuamente designados huecos. Al menos uno de estos huecos contiene una composición sólida y, en el mismo hueco, la atmósfera tiene un contenido bajo de oxígeno, p. ej., es nitrógeno o argón, o es vacío. Una forma conveniente de colocar el 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol sólido allí dentro es colocar antes una solución conteniendo 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol y el aditivo en el vacío y luego evaporar la solución, preferiblemente en una atmósfera que tenga un contenido bajo de oxígeno, p. ej., en nitrógeno o argón, o en vacío. De esta manera, el residuo de evaporación, es decir, la composición sólida es colocada directamente en el vacío en dicho dispositivo (sistema de administración).

30 Según una forma de realización, esta invención se refiere a un recipiente que es un dispositivo que tiene uno o más huecos entre los cuales al menos uno de los huecos contiene una atmósfera con un contenido bajo de oxígeno y la composición sólida. De forma alternativa, hay vacío en el recipiente.

Puesto que las composiciones sólidas deben ser usadas para el tratamiento de ovocitos, es importante que las composiciones sólidas no contengan ingredientes que influyan los ovocitos negativamente.

35 Según otra forma de realización, esta invención se refiere a un recipiente que contiene una composición sólida que puede ser usada para preparar una solución acuosa con las características mencionadas en cualquiera de las siguientes formas de realización preferidas. Según una forma de realización preferida, esta invención se refiere a un recipiente que contiene una composición sólida que puede ser usada para preparar una solución acuosa que cuando se usa para el tratamiento de ovocitos pueda producir un porcentaje de descomposición del vehículo germinal (GVB) de al menos el 50%, preferiblemente al menos el 80%. Según una forma de realización preferida, esta invención se refiere a un recipiente que contiene una composición sólida de la que, cuando se añade un medio acuoso a la composición sólida, se puede obtener una solución que contiene 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol en una concentración de aproximadamente por encima de 0,001 μ g/ml, preferiblemente aproximadamente por encima de 0,01 μ g/ml, más preferido aproximadamente por encima de 0,1 μ g/ml, incluso más preferido aproximadamente por encima de 1,0 μ g/ml, y más preferido aproximadamente 10 μ g/ml, e incluso más preferido aproximadamente 100 μ g/ml. Según una forma de realización preferida, esta invención se refiere a un recipiente que contiene una composición sólida de la que, cuando se añade un medio acuoso a la composición sólida, se puede obtener una solución que contiene 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol en una concentración por debajo de aproximadamente 0,1 g/ml, preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,01 g/ml. Según una forma de realización preferida, esta invención se refiere a un recipiente que contiene una composición sólida de la que, cuando se añade agua a la composición sólida, se puede obtener una solución acuosa donde el contenido de solvente orgánico está por debajo de aproximadamente 0,1%, preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,05%, mucho más preferido por debajo de aproximadamente 0,01%.

55 Una manera de usar las composiciones sólidas es disolver la composición en un medio acuoso tal como agua y luego, si se desea, añadir otros ingredientes que puedan tener un efecto favorable en la maduración de los ovocitos.

Otra forma de usar la composición es disolverla en un medio normalmente usado para IVF o IVM.

La mención aquí de una referencia no quiere decir que constituya técnica anterior.

60 Aquí, la palabra “comprende” debe interpretarse que significa ampliamente “incluye”, “contiene” o “abarca” (véase, las directrices de la OEP C 4.13).

65 La presente invención es ilustrada con mayor detalle por los ejemplos siguientes los cuales, no obstante, no deben ser interpretados como limitadores del objeto de protección. Las características descritas en la descripción precedente y en los ejemplos siguientes pueden, en cualquiera de sus combinaciones, constituir el material para realizar la invención en diversas formas de la misma.

ES 2 301 627 T3

Ejemplo 1

Método usado para determinar si un compuesto puede ser usado como aditivo en las composiciones sólidas o no.

Un aditivo para composiciones FF-MAS se caracteriza por:

Mejorar la solubilidad de FF-MAS en etanol/agua (1:2.5 v/v)

Asegurar una solución clara de FF-MAS después de reconstituir la composición en un medio MEM alfa.

Asegurar un porcentaje de GVB de al menos el 50% preferiblemente el 80% cuando se prueba en ovocitos obtenidos de ratones hembra inmaduros.

Prepare una solución saturada etanólica de FF-MAS. Mezcle con una solución acuosa el aditivo en la relación 1:2.5. Por inspección visual controle que un exceso de FF-MAS esté disponible en la solución. Gire la solución durante 24 horas a temperatura ambiente. Filtre la solución a través de un filtro de 0,22 μm , determine el contenido de FF-MAS por HPLC y calcule la solubilidad. Transfiera 350 μl a una placa de 4 pocillos y evapore hasta secar a temperatura ambiente. Añada 500 μl de medio MEM alfa (Gibco). Si una solución clara es obtenida dentro de media hora, la composición es probada en ovocitos obtenidos de ratones hembra inmaduros. El % GVB obtenido es al menos 50%, preferiblemente 80%, véase ejemplo 1.

Ejemplo 2

Composición conteniendo Albúmina de Suero Humano (HSA)

Se disolvió FF-MAS en etanol (25 μg FF-MAS/ml etanol). Se disolvió HSA en agua (1%). Se mezcló 100 μl de la solución anteriormente mencionada de etanol (correspondiente a la cantidad de FF-MAS necesaria para un tratamiento) y 350 μl de la solución mencionada arriba de HSA en un vial de vidrio. La mezcla resultante de FF-MAS y HSA fue evaporada hasta secarse por corriente de aire de argón. Una vez evaporado el líquido, se selló el vial con una membrana de goma y se puso el vial a una temperatura de 2-8°C. En el momento de usarlo, se añadió 500 μl de medio para IVM recién preparado al residuo en el vial y se agitó suavemente durante 1-2 minutos. El medio IVM usado fue TCM 199 con Sales de Earle (Sigma) al que se añadió HSA al 0,8%, 2 mM de L-glutamina, 0,25 mM de pirovato de sodio, 100 IU/ml de bencilpenicilina, y 100 microgramos/ml de estreptomicina. El líquido fue transferido a una placa de 4 pocillos y la composición fue probada en ovocitos obtenidos de ratones hembra inmaduros. Porcentaje GVB obtenido, ver abajo en Tabla 1. La estabilidad de la formulación, al igual que la recuperación de FF-MAS de los viales fueron continuamente seguidos, ver abajo en Tabla 2.

TABLA 1

Datos GVB para FF-MAS en combinación con HSA

Contenido de HSA en cada vial: 6 mg/ml			
Sustancia	Dosis FF-MAS ($\mu\text{mol/l}$)	Número de ovocitos	%GVB
Control	-	35	14
FF-MAS*	10	35	43
FF-MAS	0,24	35	86
FF-MAS	0,48	33	88
FF-MAS	1,2	35	91
FF-MAS	2,4	34	97
HSA-control	-	33	9
* control interno disuelto en etanol			

TABLA 2

Estabilidad de FF-MAS en combinación con HSA

Contenido de FF-MAS en cada vial: 10 µg/ml			
Contenido de HSA en cada vial: 5 mg/ml			
Condiciones de almacenamiento	Meses de almacenamiento	Ensayo µg/ml	% Recuperación
5°C	2 meses	10,15	101%
	3 meses	10,3	103%
25 °C / 60% RH	2 meses	9,71	97%
	3 meses	9,5	95%
"RH" designa humedad relativa.			

Ejemplo 3

Preparación

Se disolvió FF-MAS en etanol (20 µg de FF-MAS/ml etanol) y se disolvió HSA en agua (1%). Se mezcló 100 µl de la solución anteriormente mencionada de etanol (correspondiente a la cantidad de FF-MAS necesaria para un tratamiento) y 250 µl de la solución mencionado arriba de HSA y se dividió 350 µl del líquido combinado en partes alícuotas en unos viales de vidrio. Los viales fueron puestos a -80°C durante una noche. Todas las muestras fueron después liofilizadas a -45°C durante 16 horas seguidas de 8 horas de liofilización a -15°C y 8 horas de liofilización a +25°C. Antes de abrir el liofilizador todos los viales fueron automáticamente sellados con membranas de goma por una presión de nitrógeno. Los viales fueron cerrados con una cápsula y puestos a una temperatura de 2-8°C. En el momento de usarlo, se añadió 500 µl de medio para IVM recién preparado al residuo en cada vial y se agitó suavemente durante 1-2 minutos. El medio para IVM usado fue el mismo que fue usado en el ejemplo 2. El líquido fue transferido a una placa de 4 pocillos y la composición fue probada en ovocitos obtenidos de ratones hembra inmaduros. Porcentaje GVB obtenido, ver abajo en Tabla 3. La recuperación de FF-MAS de los viales fue determinado en una HPLC en aproximadamente el 105%, correspondiente a 2,10 µg de FF-MAS/vial.

TABLA 3

Datos GVB de 2 pruebas en FF-MAS+HSA comparados con control interno

Sustancia	Dosis FF-MAS (µmol/l)	Número de ovocitos	%GVB
FF-MAS*	10/10	27/41	85/83
FF-MAS + HSA	5/5	28/108	100/95
*control interno, FF-MAS disuelto en etanol			

Ejemplo 4

Se realizó una comparación en la solubilidad de FF-MAS en soluciones conteniendo bien albúmina humana recombinante (de ahora en adelante designada r-HA) o HSA. Las soluciones fueron preparadas como en el ejemplo 4, con 2,5 mg de HSA o r-HA en cada vial junto con 2 µg de FF-MAS. Las soluciones fueron filtradas a través de un filtro de 0,22 µm pero no se liofilizaron antes del análisis. Los datos de recuperación están relacionados en la tabla 4 abajo.

ES 2 301 627 T3

TABLA 4

Recuperación de FF-MAS de las soluciones antes de la liofilización

EtOH:Agua	FF-MAS + HSA	FF-MAS + r-HA
1:2,5	62%	37%
1:5	90%	59%
1:12,5	90%	85%
1:25	76%	66%
1:50	81%	46%
1:100	75%	24%

Como se ha visto en la Tabla 4, la proporción ideal entre etanol y agua es aproximadamente 1:12,5.

Ejemplo 5

Se disolvió FF-MAS en etanol (77 μ g de FF-MAS/ml etanol) y se disolvió HSA o r-HA en agua (1%). Se mezcló 26 ml de la solución anteriormente mencionada de etanol y 324 ml de la solución mencionada arriba de HSA o solución de r-HA y se dividió 350 μ l del líquido combinado en partes alícuotas en viales de vidrio (correspondiente a la cantidad de FF-MAS necesaria para un tratamiento IVM). Los viales fueron puestos a -35°C durante una noche. Todas las muestras fueron luego liofilizadas a -30°C durante 16 horas seguidas de 8 horas de liofilización a -15°C y 8 horas de liofilización a +25°C. Antes de abrir el liofilizador todos los viales fueron automáticamente sellados con membranas de goma al vacío. Los viales fueron cerrados con una cápsula y almacenados para probar la estabilidad. En el momento de usarlo, se añadió 500 μ l de medio para IVM recién preparado al residuo en cada vial y se agitó suavemente durante 1-2 minutos. El medio para IVM usado fue el mismo que el usado en el ejemplo 2. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 5.

TABLA 5

	- 18°C	+5°C	25°C/60% RH	40°C
FF-MAS+HSA	Ninguna degradación significativa después de 6 meses.	Ninguna degradación significativa después de 6 meses.	Ninguna degradación significativa después de 6 meses.	Ninguna degradación significativa después de 6 meses.
FF-MAS+r-HA	N/A	Ninguna degradación significativa después de 3 meses.	N/A	N/A
"RH" designa humedad relativa.				

Ejemplo 6

Para probar la robustez de la formulación, se prepararon soluciones en masa con diferentes proporciones entre FF-MAS y HSA. La recuperación de FF-MAS fue determinada en HPLC en las soluciones en masa y ninguna de las muestras fue liofilizada. La proporción entre etanol y agua fue mantenida a 1:12.5 en todas las muestras. Ver los resultados en la tabla 6, n=2 en todas las muestras. Los análisis fueron realizados justo después de la preparación.

TABLA 6

	FF-MAS/vial	HSA/vial	Proporción FF-MAS: HSA	Contenido de FF-MAS en masa	FF-MAS encontrado	Recuperación
I	50µg	2,5 mg	1:50	143µg/ml	133µg/ml	93%
II	10µg	2,5 mg	1:250	29µg/ml	27,7µg/ml	96%
III	1µg	2,5 mg	1:2500	2,9µg/ml	2,61µg/ml	90%
IV	0,1µg	2,5 mg	1:25000	0,29µg/ml	0,29µg/ml	100%

Durante la preparación se observó una precipitación ligera en la solución conteniendo la cantidad máxima de FF-MAS (143 µg/ml), pero como se ha visto en la tabla 6, la recuperación de FF-MAS de todas las soluciones fue del 90%, lo cual es muy satisfactorio.

Ejemplo 7

Se realizó una prueba en ovocitos de ratón en formulaciones con FF-MAS y r-HA preparadas como se describe en el ejemplo 4 y posteriormente liofilizadas como se describe en el ejemplo 6. Se condujeron 5 pruebas y los resultados están relacionados en la tabla 7.

TABLA 7

Datos GVB de 5 pruebas en FF-MAS+r-HA comparados con control interno

Sustancia	Dosis de FF-MAS (µmol/l)	Número de ovocitos probados	%GVB
FF-MAS*	10	180	85
FF-MAS + r-HA	5	188	87
*Control interno, FF-MAS disuelto en etanol			

Referencias citadas en la descripción

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

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 9828323 A [0002]

REIVINDICACIONES

1. Recipiente cerrado que tiene un contenido de oxígeno que está por debajo de aproximadamente 0,01 mol por litro de volumen del recipiente y que contiene además 4,4-dimetil-5 α -colest-8,14,24-trien-3 β -ol.

2. Recipiente cerrado, según la reivindicación precedente que contiene una composición sólida con una solubilidad alta en agua comprendiendo 4,4-dimetil-5 α -colest-8,14,24-trien-3 β -ol y un aditivo donde la solubilidad alta en agua está aproximadamente por encima de 0,001 μ g/ml.

3. Recipiente, según la reivindicación precedente, **caracterizado** por el hecho de que el aditivo es una proteína o un fosfoglicérido, preferiblemente albúmina de suero, mucho más preferiblemente albúmina de suero humano, opcionalmente en forma recombinante.

4. Recipiente, según la reivindicación precedente, **caracterizado** por el hecho de que el aditivo es albúmina de suero, opcionalmente en forma recombinante.

5. Recipiente, según la reivindicación precedente, **caracterizado** por el hecho de que el aditivo es albúmina de suero humano, opcionalmente en forma recombinante.