



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월21일

(11) 등록번호 10-1513181

(24) 등록일자 2015년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/08 (2006.01) **A61K 38/24** (2006.01)

A61P 5/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7012131

(22) 출원일자(국제) 2008년10월29일

심사청구일자 2013년10월07일

(85) 번역문제출일자 2010년06월01일

(65) 공개번호 10-2010-0088147

(43) 공개일자 2010년08월06일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/064679

(87) 국제공개번호 WO 2009/056569

국제공개일자 2009년05월07일

(30) 우선권주장

07119832.9 2007년11월01일

유럽특허청(EPO)(EP)

61/004,481 2007년11월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

EP0448146 A

US20040224896 A1

(73) 특허권자

메르크 세로노 에스. 에이.

스위스, 코인신스, 쾰에이치-1267, 센터 인터스트리엘

(72) 발명자

아고스티네토, 리타

이탈리아 아이-00040 로카 디 파파 (알렘) 비아 발레 산 로렌조 2이5

사마리타니, 파브리치오

이탈리아 아이-00139 로마 130 비아 루이지 치알라

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 28 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **LH 액체 제형**

(57) 요약

본 발명은 단일- 또는 다중-용량 투여용 황체형성 호르몬(LH)의 액체 약제 제형에 관한 것이다.

(72) 발명자

텔 리오, 알렉산드라

이탈리아 아이-00144 로마 비아 일데브란도 비반티
108

리차드, 조엘

프랑스 에프-78490 몬트포트 엘' 아마우리 루 데
브레타그네 5

명세서

청구범위

청구항 1

10 내지 50 mg/ml의 아르기닌 또는 이의 염, 10 내지 50 mg/ml의 리신 또는 이의 염, 또는 10 내지 50 mg/ml의 아르기닌 또는 이의 염 및 10 내지 50 mg/ml의 리신 또는 이의 염을 포함하는 것을 특징으로 하는, 황체형성 호르몬(LH)을 함유하는 액체 제형.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 황체형성 호르몬(LH)이 사람 황체형성 호르몬(hLH)인 제형.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 황체형성 호르몬(LH)이 재조합 사람 황체형성 호르몬(r-hLH)인 제형.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 황체형성 호르몬(LH)이 비노계 사람 황체형성 호르몬(u-hLH)인 제형.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 황체형성 호르몬(LH)이 1 내지 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 존재하는 제형.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 포스페이트 완충액을 추가로 포함하는 제형.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 포스페이트 완충액이 1 내지 100 mM의 농도로 존재하는 제형.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 포스페이트 완충액이 소듐 포스페이트 완충액인 제형.

청구항 11

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 계면활성제를 추가로 포함하는 제형.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 계면활성제가 트윈 20인 제형.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 트윈 20이 0.01 내지 10 mg/ml의 농도로 존재하는 제형.

청구항 14

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 메티오닌을 추가로 포함하는 제형.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 메티오닌이 0.01 내지 5.0 mg/ml의 농도로 존재하는 제형.

청구항 16

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 정균제를 추가로 포함하는 제형.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 정균제가 벤질 알코올, 페놀, 및 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 제형.

청구항 18

제 16항에 있어서, 상기 정균제가 0.005 내지 15 mg/ml의 농도로 존재하는 제형.

청구항 19

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 주사용 증류수를 추가로 포함하는 제형.

청구항 20

제 1항 또는 제 2항에 있어서, pH가 7.5 내지 8.5의 범위를 갖는 제형.

청구항 21

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 적어도 25 μ g/ml의 r-hLH, 1.65 mg/ml의 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.104 mg/ml의 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 31.5 mg/ml의 L-아르기닌 모노히드로클로라이드, 0.05 mg/ml의 트윈 20, 0.5 mg/ml의 메티오닌 및 5 mg/ml의 페놀을 포함하는 제형.

청구항 22

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 적어도 25 μ g/ml의 r-hLH, 1.65 mg/ml의 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.104 mg/ml의 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28.5 mg/ml의 리신 모노히드로클로라이드, 0.05 mg/ml의 트윈 20, 0.5 mg/ml의 메티오닌 및 12 mg/ml의 벤질알코올을 포함하는 제형.

청구항 23

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 적어도 25 μ g/ml의 r-hLH, 1.65 mg/ml의 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.104 mg/ml의 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28.5 mg/ml의 리신 모노히드로클로라이드, 0.05 mg/ml의 트윈 20, 0.5 mg/ml의 메티오닌, 3 mg/ml의 벤질알코올 및 0.01 mg/ml의 벤즈알코늄 클로라이드를 포함하는 제형.

청구항 24

제 1항 또는 제 2항에 따른 제형을 포함하는 여성, 남성, 또는 여성 및 남성의 불임증 치료용 약제 조성물.

청구항 25

사용 전 저장을 위한 컨테이너에서 살균 상태로 밀폐 밀봉된, 제 1항 또는 제 2항에 따른 제형.

청구항 26

황체형성 호르몬(LH)을 수성 희석제로 희석시키는 것을 포함하는, 제 1항 또는 제 2항에 따른 제형을 제조하는 방법.

청구항 27

약제를 제조하기 위해 사용되는 제 1항 또는 제 2항에 따른 제형.

청구항 28

여성, 남성, 또는 여성 및 남성의 불임증 치료용 약제를 제조하기 위해 사용되는 제 1항 또는 제 2항에 따른 제형.

청구항 29

난포-자극 호르몬(FSH)을 포함하는 액체 제형과 조합되어 사용되는 제 1항 또는 제 2항에 따른 제형.

청구항 30

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 여성, 남성, 또는 여성 및 남성의 불임증을 치료하기 위한 제형.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 황체형성 호르몬(LH)의 액체 약제 제형 분야 및 이러한 제형을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 황체형성 호르몬(LH), 난포-자극 호르몬(FSH) 및 융모 생식샘자극호르몬(CG)은 생식샘자극호르몬의 부류에 속하는 주입가능한 단백질이다. LH, FSH 및 CG는 여성 및 남성 환자 둘 모두에서 불임증 및 생식기 질환의 치료에 단독 및 조합되어 사용된다.

[0003] 사실상, FSH 및 LH는 뇌하수체에서 생성된다. 약제 용도를 위해, FSH 및 LH와 이의 변이체는 재조합에 의해 생성될 수 있거나 (rFSH 및 rLH) 폐경후 여성의 소변으로부터 생성될 수 있다 (uFSH 및 uLH).

[0004] FSH는 보조 생식술(ART)을 위한 배란 유도(OI) 및 제어된 난소 과자극(COH)에서 여성 환자에게 이용된다. 배란 유도를 위한 전형적인 치료 요법은 환자에게 FSH 또는 FSH 변이체 (약 75 내지 300 IU FSH/일)를 약 6 내지 약 12일 동안 매일 주입 투여하는 것이다. 제어된 난소 과자극을 위한 전형적인 치료 요법은 환자에게 FSH 또는 FSH 변이체 (약 150-600 IU FSH/일)를 약 6 내지 약 12일 동안 매일 주입 투여하는 것이다.

[0005] FSH는 또한 땀정자증을 겪는 남성에게서 정자발생을 유도하기 위해 이용된다. 매주 2회의 2'500 IU hCG와 조합하여 매주 3회의 150 IU FSH를 이용한 요법이 저성선자극호르몬 성선저하증(hypogonadotrophic hypogonadism)에 걸린 남성에서 정자수의 개선을 달성하는데 성공적이었다 (Burgues et al., 1997).

[0006] LH는 여성 환자, 특히 저성선자극호르몬 성선저하증에 걸린 여성과 같이 매우 낮은 내인성 LH 수준이나 LH에 내성을 갖는 환자 (HH, WHO 그룹 1) 또는 노령 환자 (즉 35세 이상), 및 배아 이식이나 조기 유산이 문제인 환자에서 OI 및 COH에 있어서 FSH와 함께 사용된다. FSH와 조합된 LH는 전통적으로 폐경후 여성의 소변에서 추출된 사람 폐경 생식샘자극호르몬(hMG)이라 불리는 제조물로 이용가능하다. hMG는 1:1 비의 FHS:LH 활성을 갖는다.

[0007] CG는 LH와 동일한 수용체에서 작용하고 동일한 반응을 유발한다. CG는 LH보다 긴 순환 반감기를 지니므로 보통 LH-활성의 지속성(long-acting) 공급원으로서 사용된다. CG는 천연 LH 피크를 흉내내고 배란을 일으키기 위해 OI 및 COH 요법에 이용된다. 사람 융모 생식샘자극호르몬(hCG)의 주입은 FSH 또는 FSH의 혼합물 및 LH를 이용한 자극의 끝에 배란을 일으키기 위해 사용된다. CG는 또한 상기 언급된 바와 같이 LH-활성이 요망되는 환자를 자극하는 동안 LH-활성을 제공하기 위해, OI 및 COH를 위한 자극 동안 FSH와 함께 사용될 수 있다.

[0008] FSH, LH 및 CG는 갑상샘 자극 호르몬(TSH)도 포함하는 이종이합체, 당단백질 호르몬 패밀리의 구성원이다. 이 패밀리의 구성원들은 α - 및 β -서브유닛을 포함하는 이종이합체이다. 서브유닛은 비공유 상호작용에 의해 함께 유지된다. 사람 FSH (hFSH) 이종이합체는 (i) 다른 사람 패밀리의 구성원(즉 융모 생식샘자극호르몬("CG"), 황체형성 호르몬("LH") 및 갑상샘 자극 호르몬("TSH"))에도 공통인 천연 92개 아미노산 당단백질 알파 서브유닛; 및 (ii) FSH에 유일한 성숙 111개 아미노산 베타 서브유닛으로 구성된다 (Shome et al., 1974 및 1988). 사람 LH 이종이합체는 (i) 성숙 92개 아미노산 당단백질 알파 서브유닛; 및 (ii) LH에 유일한 성숙 112개 아미노산 베타 서브유닛으로 구성된다 (Keutmann et al., 1979; Talmadge et al., 1984; Fiddes & Talmadge, 1984). 당단백질의 알파 및 베타 서브유닛은 보존제, 계면활성제 및 다른 부형제와의 상호작용으로 인해 제형에서 분리되는 경향이 있을 수 있다. 서브유닛의 분리는 생물학적 활성의 손실을 야기한다 (Reichert & Ramsey, 1975).

[0009] FSH는 근내 (IM) 또는 피하 (SC) 주입을 위해 제형화된다. FSH는 바이알 또는 앰플에 75 IU/바이알 및 150 IU/

바이알의 냉동건조된 (고체) 형태로 공급되며 반감기는 2-25℃에서 저장시 약 2년이다. 주입용액은 냉동건조된 생성물을 주사용 증류수(WFI)로 재구성함에 의해 형성된다. 배란 유도 또는 제어된 난소 과자극을 위해, 75 IU 내지 600 IU의 출발 투여량을 이용한 매일 주입이 약 10일 이내로 권장된다. 환자의 반응에 따라서, 증가되는 투여량의 FSH를 이용한 3회 이하의 치료 사이클이 사용될 수 있다. 냉동건조된 제형을 이용하여, 환자는 새로운 바이알의 냉동건조된 물질을 희석제로 재구성하고 이것을 재구성 직후 매일 단위로 투여할 것이 요구된다 [Package insert N1700101A, published in February 1996, for Fertinex™ (urofollicotropin for injection, purified) for subcutaneous injection, by Serono Laboratories, Inc., Randolph, MA].

- [0010] FSH는 또한 단일용량 및 다중용량 액체 포맷, 바이알 또는 앰플로 제형화되어 왔다. 단일용량 포맷은 사용 전 저장시에 안정하고 활성인 채로 유지되어야 한다.
- [0011] 다중용량 포맷은 사용 전 저장시에 안정하고 활성인 채로 유지되어야 할 뿐만 아니라 앰플의 밀봉을 뜯은 후에 여러 날의 투여 기간 동안 안정하고, 활성이며 비교적 세균이 없는 상태로도 유지되어야 한다. 이러한 이유로, 다중용량 포맷은 종종 정균제를 함유한다.
- [0012] LH는 근내 (IM) 또는 피하 (SC) 주입을 위해 제형화된다. LH는 바이알 또는 앰플에 75 IU/바이알의 냉동건조된 (고체) 형태로 공급되며 반감기는 2-25℃에서 저장시 약 2년이다. 주입용액은 냉동건조된 생성물을 주사용 증류수(WFI)로 재구성함에 의해 형성된다. 배란 유도 또는 제어된 난소 과자극을 위해, FSH와 함께, 75 IU 내지 600 IU LH의 출발 투여량을 이용한 매일 주입이 약 10일 이내로 권장된다.
- [0013] EP 0 618 808 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.)은 생식샘자극호르몬과 안정량의 수크로오스를 단독으로 또는 글리신과 조합시킨 고체 인티메이트(intimate) 혼합물을 포함하는 약제 조성물을 개시한다.
- [0014] EP 0 814 841 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.)은 재조합 사람 용모 생식샘자극호르몬(hCG) 및 안정량의 만니톨을 포함하는 안정한 액체 약제 조성물을 개시한다.
- [0015] WO 2004/087213 (Ares Trading S.A.)은 난포-자극 호르몬(FSH) 또는 이의 변이체 및/또는 황체형성 호르몬(LH) 또는 이의 변이체 뿐만 아니라 플루로닉®F77, 플루로닉 F87, 플루로닉 F88 및 플루로닉 F68로부터 선택된 계면활성제를 포함하는 액체 및 냉동-건조된 약제 조성물을 개시한다.
- [0016] WO 2004/112826 (Ares Trading S.A.)은 난포-자극 호르몬(FSH) 또는 이의 변이체 및 황체형성 호르몬(LH) 또는 이의 변이체 뿐만 아니라 트윈 20, 트윈 40 및 트윈 80을 포함하는 폴리소르바트로부터 선택된 계면활성제를 포함하는 냉동-건조된 제형을 개시한다.
- [0017] WO 00/04913 (Eli Lilly and CO.)은 알파 및 베타 서브유닛을 함유하는 FSH 또는 FSH 변이체, 및 수성 희석제 중 페놀, m-크레솔, p-크레솔, o-크레솔, 클로로크레솔, 벤질 알코올, 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 소듐 테하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 보존제를 포함하는 제형을 개시한다.
- [0018] WO 2004/105788 (Ferring B.V.)은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체에서 FSH 및 hCG로 구성된 약제 조성물을 개시한다.
- [0019] EP 0 448 146 (AKZO N.V.)은 생식샘자극호르몬 및 안정량의 디카르복실산염을 포함하는 안정화된 생식샘자극호르몬-함유 냉동건조물을 개시한다.
- [0020] EP 0 853 945 (Akzo Nobel N.V.)는 제형이 생식샘자극호르몬 및 안정량의 폴리카르복실산 또는 이의 염과 티오에테르 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 액체 생식샘자극호르몬-함유 제형을 개시한다.
- [0021] 단일용량 또는 다중용량 투여를 위해 LH 또는 LH 변이체의 안정한 액체 제형에 대한 요구가 남아 있다.

발명의 내용

- [0022] **발명의 개요**
- [0023] 본 발명의 목적은 LH 또는 LH 변이체의 액체 제형, 이들의 제조 방법, 및 불임 질환을 치료하는데 있어서 이들의 약제학적 또는 수의적 사용 방법을 제공하는 것이다.
- [0024] 제1 측면에서, 본 발명은 LH 또는 LH 변이체의 정제된 제조물, 및 안정량의 아르기닌 또는 이의 염 및/또는 리신 또는 이의 염을 포함하는 LH 또는 LH 변이체의 액체 제형을 제공한다.

- [0025] 제2 측면에서, 본 발명은 a) LH 또는 LH 변이체의 용액을 형성하는 단계, 및 b) 상기 용액에 안정량의 아르기닌 또는 이의 염 및/또는 리신 또는 이의 염을 첨가하는 단계를 포함하여, LH 또는 LH 변이체의 액체 제형을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0026] 제3 측면에서, 본 발명은 사용 전 저장에 적합한 컨테이너에서 살균 조건 하에 밀폐 밀봉된, 본 발명의 액체 제형을 포함하는 LH 또는 LH 변이체의 액체 제형의 제시 형태를 제공한다. 컨테이너는 앰플, 바이알, 주사기 또는 카트리지가 될 수 있다.
- [0027] 제4 측면에서, 본 발명은 패키징 물질과, 본 발명에 따른 LH 또는 LH 변이체의 액체 제형 및 정균제를 포함하는 컨테이너를 포함하는 사람 약제 용도를 위한 제품을 제공하고, 여기서 상기 패키징 물질은 그 제형이 첫 번째 사용 이후 28일 또는 그 초과 기간 동안 보관될 수 있음을 나타내는 라벨을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 추가의 목적은 FSH 또는 FSH 변이체의 액체 제형과 함께 본 발명에 따른 LH 또는 LH 변이체의 액체 제형의 사용을 제공하는 것이다.
- [0029] **도면의 간단한 설명**
- [0030] 도 1은 다양한 농도 (6, 12 및 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 r-hLH), 컨테이너 (주사기 및 카트리지) 및 충전 부피 (0.25, 0.5 및 1 ml)를 지니는 r-hLH 제형의 크로마토그래피 프로파일 (SE-HPLC에 의해)의 비교를 도시한다. 이러한 제형은 r-hLH 이외에 포스페이트 완충액, 사카로오스, 트윈 20, 메티오닌, 벤질 알코올, 벤즈알코늄 클로라이드 및 주사용 증류수를 함유한다. 점선은 0.25 ml의 충전 부피에 해당하고; 대시로 표시된 선은 0.5 ml의 충전 부피이며; 실선은 1 ml의 충전 부피이다. (A) 주사기 중 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 r-hLH 제형. (B) 카트리지 중 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 r-hLH 제형. (C) 주사기 중 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 r-hLH 제형. (D) 카트리지 중 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 r-hLH 제형. (E) 주사기 중 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 r-hLH 제형. (F) 카트리지 중 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 r-hLH 제형. 체류 시간 8.5분에서의 피크는 완전한 이중이합체(비공유 결합을 통해 결합된 알파+베타 서브유닛)인 한편, 보다 높은 체류 시간에서의 피크 (약 9.5분)는 유리-서브유닛이다. AU: 흡광도 유닛.
- [0031] 도 2는 각각 SAC/500/24 μg BACL_cart 및 SAC/500/24 μg _cart인, 정균제가 있고 정균제가 없는 제형 상에서 SE-HPLC에 의해 산출된 이중이합체의 비율 비교를 도시한다. (A) SE-HPLC를 +40°C에서 저장한 지 3일 후에 (3d) 수행하였다. (B) SE-HPLC를 +33°C에서 저장한 지 8일 후 (8d), 4주 후 (4w), 6주 후 (6w), 8주 후 (8w) 및 13주 후 (13w)에 수행하였다.
- [0032] **발명의 상세한 설명**
- [0033] 본 발명의 액체 LH 제형은 개선되거나 더욱 적합한 특성 또는 안정성을 지니고, 여성 및/또는 남성에서 불임증 치료에 유용하다.
- [0034] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 액체 제형은 피하 및/또는 근내 주입을 위한 것이다.
- [0035] 본 발명에 따른 LH 또는 LH 변이체 액체 제형의 적합한 특성 또는 안정성은 활성 또는 안정성의 손실을 예방 또는 감소시키거나, 투여의 유효성 또는 적합성의 임의의 측면, 예컨대 사용 방식, 빈도, 투여량, 편안함, 용이성 중 하나 이상을 개선시킴에 의해 수득된다.
- [0036] 본원에서 사용된 황체형성 호르몬 또는 LH는 전장 성숙 단백질로서 생성된 LH를 언급하고, 이것은 재조합에 의해 생성되든지 또는 폐경후 여성의 소변과 같은 사람 공급원으로부터 분리되든지 간에 사람 LH 또는 "hLH"를 포함하나 이로 제한되지 않는다.
- [0037] "LH 변이체"라는 표현은 사람 LH와 아미노산 서열, 글리코실화 패턴 또는 서브유닛간 결합에 있어서 차이가 있으나 LH-활성을 나타내는 분자를 포함하고자 한다.
- [0038] LH와 관련된 용어 "활성"은 정낭 중량 증가법(Van Hell et al., 1964)과 같이 LH와 관련된 생물학적 반응을 유도하는 LH 제형 또는 혼합된 제형의 능력을 의미한다. LH의 생물학적 활성은 LH에 대해 허용된 표준과 관련하여 평가된다.
- [0039] 활성의 측정은 용액의 밀리리터 당 국제 유닛(IU/ml) 또는 용액의 밀리리터 당 메가 국제 유닛(MIU/ml)으로 표시된다. (1 MIU/ml = 1,000,000 IU/ml). 국제 유닛은 내셔널 인스티튜트 오브 헬스 (Bethesda, Maryland)에 의해 출간된 리서치 레퍼런스 리에이전트 노트 No. 35에 개시된 대로 산출된다.
- [0040] LH 또는 LH 변이체는, 예컨대 재조합에 의해서나, 본 경우일 수 있는 천연원으로부터의 분리 또는 정제에 의해

서, 또는 화학적 합성이나 이들의 임의의 조합과 같은 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다.

[0041] 용어 "재조합"의 사용은 재조합 DNA 기술 (WO 85/01958 참조)의 사용을 통해 생성된 LH 또는 LH 변이체의 제조를 의미한다. 재조합 기술을 이용하여 LH를 발현시키는 방법 중 일례는 유럽특허 EP 0 211 894 및 EP 0 487 512에 개시된 대로, 하나의 벡터 또는 각각의 서브유닛이 분리된 프로모터를 지니는 두 개의 벡터 상에 제공되든 간에 진행 세포를 LH의 알파 및 베타 서브유닛을 엔코딩하는 DNA 서열로 트랜스펙션하는 것이다.

[0042] LH를 생성하기 위해 재조합 기술을 사용하는 또 다른 일례는 유럽특허 EP 0 505 500 (Applied Research Systems ARS Holding NV)에 개시된 대로, LH의 서브유닛을 엔코딩하는 내인성 서열에 작동적으로 결합되는 이중 조절 세그먼트를 삽입하는 동종 재조합의 사용이다.

[0043] 본원에서 사용된 난포 자극 호르몬 또는 FSH는 전장 성숙 단백질로서 생성된 FSH를 언급하며 이로 제한되는 것은 아니나 재조합에 의해 생성되든지 또는 폐경후 여성의 소변과 같은 사람 공급원으로부터 분리되든지 간에 사람 FSH 또는 "hFSH"를 포함한다.

[0044] 표현 "FSH 변이체"는 아미노산 서열, 글리코실화 패턴 또는 서브유닛간 결합에 있어서 사람 FSH와 상이하나 FSH-활성을 나타내는 분자를 포함하고자 한다.

[0045] FSH와 관련된 용어 "활성"은 스틸만-폴리(Steelman-Pohley) 검정 (Steelman et al., 1953)에서 난소 중량 증가, 또는 여성 환자에서 난포 성장과 같이, FSH와 관련된 생물학적 반응을 유발하는 FSH 제형 또는 혼합된 제형의 능력을 의미한다. 여성 환자에서 난포 성장은 예를 들어 자극 8일째에 평균 직경이 16 mm 또는 약 16 mm 인 난포의 수와 관련하여 초음파에 의해 평가될 수 있다. 생물학적 활성은 FSH에 대해 허용된 표준과 관련하여 평가된다.

[0046] FSH 변이체의 예로는 야생형 α -서브유닛 및 하이브리드 β -서브유닛으로 구성된 변형된 지속성 재조합 FSH인 CTP-FSH가 있고, 여기서 hCG의 카르복시 말단 펩티드는 문헌[LaPolta et al. (1992) 또는 Klein et al. (2003)]에 개시된 대로 FSH의 β -서브유닛의 C-말단에 융합되어 있다. 또한 하기 서열 (N-말단에서 C-말단)로 구성된 단일 사슬 분자인 단일 사슬 CTP-FSH도 포함된다:

β FSH	β hCG-CTP(113-145)	α FSH
-------------	--------------------------	--------------

[0047]

[0048] 여기서 β FSH는 FSH의 β -서브유닛을 나타내고, β hCG-CTP(113-145)는 hCG의 카르복시 말단 펩티드를 나타내며, α FSH는 FSH의 α -서브유닛을 나타낸다 (Klein et al. (2002)에 개시됨).

[0049] FSH의 변이체의 다른 예로는 WO 01/58493 (Maxygen), 특허 WO 01/58493의 10항 및 11항에 개시된 α - 및/또는 β -서브유닛에 통합된 추가의 글리코실화 부위를 지니는 FSH 분자 및 WO 98/58957에 개시된 서브유닛간 S-S 결합을 갖는 FSH 분자가 있다.

[0050] FSH 또는 FSH 변이체는, 예컨대 재조합에 의해서나, 본 경우일 수 있는 천연원으로부터의 분리 또는 정제에 의해서, 또는 화학적 합성이나 이들의 임의의 조합과 같은 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다.

[0051] 본 발명에 따라 사용된 FSH 또는 FSH 변이체는 포유동물 세포로부터의 것을 포함하여, 재조합 수단에 의해 생성될 수 있을 뿐 아니라 소변원과 같은 다른 생물학적 공급원으로부터 정제될 수 있다. 허용되는 방법론으로는 문헌[Hakola et al. (1997), Keene et al. (1989), Cerpa-Poljak et al. (1993), Dias et al. (1994); Flack et al. (1994), Valove et al. (1994), 미국특허 3,119,740 및 미국특허 5,767,067]에 개시된 것들이 있다.

[0052] 용어 "투여한다" 또는 "투여하는"이란 질병 또는 질환의 치료가 필요한 환자의 신체에 본 발명의 제형을 도입시키는 것을 의미한다.

[0053] 용어 "환자"는 질병 또는 질환에 대해 치료되는 포유동물을 의미한다. 환자는 이로 제한되는 것은 아니나 하기 기원의, 사람, 양, 돼지, 말, 소, 토끼 등이다.

[0054] 용어 "수성 희석제"는 물을 함유하는 액체 용매를 의미한다. 수성 용매 시스템은 물만으로 구성되거나 물과 하나 이상의 혼화성 용매로 구성될 수 있고, 당, 완충액, 염 또는 다른 부형제와 같은 용해된 용질을 함유할 수 있다. 보다 일반적으로 사용되는 비수성 용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올과 같은 단쇄 유기 알코올, 단쇄 케톤, 예컨대 아세톤, 및 폴리알코올, 예컨대 글리세롤이다.

[0055] "등장제"는 생리적으로 관용되는 화합물로서 제형에 적합한 긴장성을 부여하여 제형과 접촉하는 세포막을 가로

지르는 물의 순(net) 흐름을 예방하는 화합물이다.

- [0056] 글리세린과 같은 화합물이 일반적으로 이러한 목적을 위해 공지된 농도로 사용된다. 다른 적합한 등장제로는 아미노산 또는 단백질 (예컨대 글리신 또는 알부민), 염 (예컨대 염화나트륨) 및 당 (예컨대 덱스트로오스, 수크로오스 및 락토오스)이 있으나 이로 제한되지 않는다.
- [0057] 용어 "정균" 또는 "정균제"는 항균제로서 작용하도록 제형에 첨가되는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 본 발명의 제형을 함유하는 보존된 LH 또는 LH 변이체는 바람직하게는 사람에서 상업적으로 실용적인 다중-사용 생성물이 되도록 하는 보존 유효성에 대한 법정 또는 조정 지침을 충족하는 것이 바람직하다.
- [0058] 정균제의 예로는 페놀, m-크레솔, p-크레솔, o-크레솔, 클로로크레솔, 벤질 알코올, 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 소듐 데하이드로아세테이트 및 티메로살이 있다.
- [0059] 용어 "완충액" 또는 "생리적으로-허용되는 완충액"은 제형의 약제학적 또는 수의적 용도에 대해 안전한 것으로 공지되어 있고 제형에 요망되는 pH 범위에서 제형의 pH를 유지하거나 제어하는 효과를 지니는 화합물의 용액을 의미한다. pH를 알맞게 산성인 pH에서 알맞게 염기성인 pH로 제어하기 위해 허용되는 완충액은 이로 제한되는 것은 아니나 포스페이트, 아세테이트, 시트레이트, 아르기닌, TRIS 및 히스티딘과 같은 화합물을 포함한다. "TRIS"는 2-아미노-2-히드록시메틸-1,3-프로판디올 및 이의 임의의 약리적으로 허용되는 염을 의미한다. 바람직한 완충액은 염수 또는 허용되는 염을 지니는 포스페이트 완충액이다.
- [0060] 용어 "포스페이트 완충액"은 요망되는 pH로 조정된, 인산 또는 이의 염을 함유하는 용액을 의미한다. 일반적으로 포스페이트 완충액은 인산 또는 이로 제한되는 것은 아니나 소듐염 및 칼륨염을 포함하는 인산의 염으로부터 제조된다. 인산의 여러 염이 당 분야에 공지되어 있고, 예컨대 산의 소듐 및 칼륨 염, 이염기 및 삼염기염이 있다. 인산의 염은 또한 발생 염의 수화물을 생성하는 것으로 공지되어 있다. 포스페이트 완충액은 약 pH 4 내지 약 pH 10과 같은 pH 범위, 및 약 pH 5 내지 약 pH 9의 바람직한 범위, 및 약 7.5 내지 약 8.5의 가장 바람직한 범위를 커버할 수 있고, 가장 바람직하게는 pH 8.0 내지 약 8.0이다.
- [0061] 용어 "바이알" 또는 "컨테이너"는 넓게 말해 함유된 살균 상태로 LH 및 희석제를 보유하기에 적합한 저장소를 의미한다. 본원에서 사용된 바이알의 예로는 앰플, 카트리지, 블리스터 패키지, 또는 LH를 주사기, 펌프 (삼투성 포함), 카테터, 경피 패치, 패 또는 경점막 스프레이를 통해 환자에게 전달하기에 적합한 그러한 다른 저장소가 있다.
- [0062] 용어 "안정성"은 본 발명의 제형 중 LH의 물리적, 화학적 및 형태적 안정성을 언급한다 (생물학적 활성의 유지 포함). 단백질 제형의 불안정성은 높은 차수의 폴리머를 형성하기 위한 단백질 분자의 화학적 분해 또는 응집, 단량체로의 이중이합체의 분해, 탈글리코실화, 글리코실화의 변형, 산화 (특히 α-서브유닛) 또는 본 발명에 포함된 LH 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 감소시키는 임의의 다른 구조적 변형에 의해 야기될 수 있다.
- [0063] "안정한" 용액 또는 제형은 본원 단백질의 분해, 변형, 응집, 생물학적 활성의 손실 등의 정도가 허용될 수 있게 제어되고, 시간에 따라 허용될 수 없게 증가하지 않는 것이다. 바람직하게는 제형은 1-10°C 또는 약 1-10°C의 온도, 보다 바람직하게는 2-8°C 또는 약 2-8°C, 보다 바람직하게는 4-5°C 또는 약 4-5°C에서 6개월 동안 라벨링된 LH 활성의 적어도 80% 또는 적어도 약 80%를 보유한다. LH 활성은 정량 중량 증가 생체검정⁶에 의해 측정될 수 있다.
- [0064] 용어 "치료"는 난포 또는 고환 자극이나 LH에 의해 조절되는 임의의 다른 생리적 반응을 목적으로 LH 투여가 바람직한 환자로의 투여, 추적, 관리 및/또는 보호를 의미한다. 따라서 치료는 정자 품질의 유도 또는 개선, 남성에서 테스토스테론 방출의 자극, 또는 여성에서 난포 발생 또는 배란 유도를 위한 LH의 투여를 포함할 수 있으나 이로 제한되지 않는다.
- [0065] 표현 "다중용량 사용"은 1회를 초과하는 주입, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 초과 주입을 위한 LH 제형의 단일 앰플, 바이알 또는 카트리지의 사용을 포함하고자 한다. 주입은 바람직하게는 적어도 약 12시간, 24시간, 48시간 등의 기간에 걸쳐 바람직하게는 28일 또는 약 28일 이내의 기간 동안 수행되는 것이 바람직하다.
- [0066] 주입은 예를 들어 6, 12, 24, 48 또는 72시간의 시간 간격을 지닐 수 있다.
- [0067] 단백질의 "염"은 산 또는 염기 부가염이다. 이러한 염은 단백질에서 하전된 기들 중 임의의 하나 이상과 임의

의 하나 이상의 생리적으로 허용되는 무독성 양이온 또는 음이온 사이에 형성되는 것이 바람직하다. 유기 및 무기염은, 예를 들어 염산, 황산, 설펡산, 타르타르산, 푸마르산, 브롬화수소산, 글리콜산, 시트르산, 말레산, 인산, 숙신산, 아세트산, 질산, 아스코르브산, p-톨루엔설펡산, 벤젠설펡산, 나프탈렌설펡산, 프로피온산, 카르본산 등과 같은 산으로부터 제조된 것들 또는 예를 들어 암모늄, 나트륨, 칼륨, 칼슘 또는 마그네슘으로부터 제조된 것들을 포함한다.

- [0068] 아르기닌, 리신 또는 이들의 혼합물 또는 염으로부터 선택된 아미노산이 LH를 포함하는 안정한 액체 제형을 제조하는데 적합한 안정화제인 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 발명의 제1 측면은 황체형성 호르몬(LH) 또는 이의 변이체를 함유하는 액체 생식샘자극호르몬 제형에 관한 것이고, 상기 제형은 안정화량의 아르기닌 또는 이의 염 및/또는 리신 또는 이의 염을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0069] 액체 제형에 존재하는 안정화량의 아르기닌 또는 이의 염 및/또는 리신 또는 이의 염은 총 제형의 ml 당 약 10 내지 약 150 mg의 농도, 보다 바람직하게는 약 20 내지 약 60 mg이다.
- [0070] 바람직하게는 아르기닌 또는 이의 염의 농도가 약 10 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 보다 바람직하게는 약 20 mg/ml 내지 약 40 mg/ml, 보다 특히 바람직하게는 약 25 mg/ml 내지 약 35 mg/ml, 가장 바람직하게는 31.5 또는 약 31.5 mg/ml이다.
- [0071] 바람직하게는 리신 또는 이의 염의 농도가 약 10 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 보다 바람직하게는 약 20 mg/ml 내지 약 40 mg/ml, 보다 특히 바람직하게는 약 25 mg/ml 내지 약 35 mg/ml, 가장 바람직하게는 28.5 또는 약 28.5 mg/ml이다.
- [0072] 액체 제형 내에 있는 황체형성 호르몬(LH)은 바람직하게는 총 제형의 ml 당 약 1 내지 약 50 μ g의 농도로 존재한다. 일 구체예에서, 황체형성 호르몬(LH)은, 특히 단일 사용을 위한 것일 때 총 제형의 ml 당 약 1 내지 약 15 μ g의 농도로 존재한다.
- [0073] 추가의 구체예에서, 황체형성 호르몬(LH)은, 특히 다중 사용(다중용량)을 위한 것일 때 총 제형의 ml 당 약 15 내지 약 30 μ g의 농도로 존재한다.
- [0074] 제형 중 LH 농도는 바람직하게는 약 20 IU/ml 내지 약 2,000 IU/ml이고, 보다 바람직하게는 약 50 IU/ml 내지 약 1,000 IU/ml이고, 보다 특히 바람직하게는 약 100 IU/ml 내지 약 600 IU/ml이다.
- [0075] 바람직하게는 LH는 재조합에 의해 생성되고, 특히 바람직하게는 LH의 사람 당단백질 알파-서브유닛 및 베타-서브유닛을 코딩하는 DNA를 포함하는 발현 벡터 또는 벡터들로 트랜스펙션된 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포에서 생성된다. 알파 및 베타-서브유닛을 엔코딩하는 DNA는 동일하거나 상이한 벡터 상에 존재할 수 있다.
- [0076] 재조합 LH는 이의 비노계 대응물(countpart)에 비해 여러 이점을 지닌다. 재조합 세포를 이용한 배양 및 분리 기술은 배치간 일관성을 허용한다. 대조적으로 비노계 LH는 서브유닛의 순도, 글리코실화 패턴, 시알릴화 및 산화와 같은 특징에 있어서 배치간 크게 변화된다. 더 큰 배치-대-배치 일관성 및 재조합 LH의 순도로 인해, 호르몬은 등전압 포커싱(IEF)과 같은 기술을 이용하여 용이하게 확인되고 정량될 수 있다. 재조합 LH를 용이하게 동정하고 정량할 수 있기 때문에 바이알을 생체검정에 의해 채우기보다는 호르몬 질량에 의해 채울 수 있다(fill-by-mass).
- [0077] 바람직하게는 본 발명의 액체 제형이 완충액, 바람직하게는 포스페이트 완충액을 지니고, 바람직한 짝이온은 나트륨 또는 칼륨 이온이다. 포스페이트 염수 완충액은 돌베코의 포스페이트 완충된 염수와 같이 당 분야에 널리 공지되어 있다. 총 용액 중 완충액 농도는 약 1mM, 5mM, 9.5mM, 10mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM 및 500mM 사이로 변화될 수 있다. 바람직하게는 완충액 농도가 10mM 또는 약 10mM이다. pH가 8.0 또는 약 8.0인 포스페이트 이온의 10mM 완충액이 특히 바람직하다.
- [0078] 바람직하게는 완충액은 본 발명의 액체 제형이 약 pH 7.8, pH 8.0 및 8.2를 포함하여, 약 7.0 및 약 9.0, 보다 바람직하게는 약 7.5 내지 약 8.5의 pH를 지니도록 조정된다. 본 발명은 단일 용량 또는 다중용량일 수 있는 LH 또는 LH 변이체의 액체 제형에 관한 것이다.
- [0079] 다중용량 사용을 위한 본 발명의 이러한 액체 LH 제형은 정균제, 예컨대 페놀, m-크레솔, p-크레솔, o-크레솔, 클로로크레솔, 벤질 알코올, 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 소듐 데하이드로아세테이트 및 티메로살을 포함한다. 벤질 알코올, 페놀, 및 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물이 바람직하다. 정균제는 약 12시간 또는 약 24시간 내지 약 12일 또는 약 14일, 바람직하게는 약 6일 내지 약 28일일 수 있는, 다중용량 주입 기간에 걸쳐 본질적으로 세균이 없는 (주입에 적

합한) 제형을 유지하기에 효과적인 농도를 제공할 양으로 사용된다.

- [0080] 정균제는 약 0.005 내지 약 15 mg/ml, 보다 바람직하게는 약 0.01 내지 약 12 mg/ml의 농도로 존재하는 것이 바람직하다. 정균제는 약 0.1% (정균제 질량/용매 질량) 내지 약 2.0%, 보다 바람직하게는 약 0.2% 내지 약 1.0%의 농도로 존재하는 것이 바람직하다.
- [0081] 벤질 알코올의 경우, 0.9% 또는 1.2%의 농도가 특히 바람직하다. 페놀의 경우, 0.5% 또는 약 0.5%가 특히 바람직하다. 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물의 경우, 0.3% 및 0.001%의 농도가 각각 특히 바람직하다.
- [0082] 바람직하게는 본 발명의 제형은 메티오닌, 소듐 비설파이트, 에틸렌디아민에트라아세트산의 염 (EDTA), 부틸화된 히드록시톨루엔(BHT), 및 부틸화된 히드록시 아니솔 (BHA)과 같은 항산화제를 함유한다. 메티오닌이 가장 바람직하다. 항산화제는 LH(특히 α -서브유닛)의 산화를 막는다.
- [0083] 항산화제, 예컨대 메티오닌은 (약) 0.01 내지 (약) 5.0 mg/ml, 보다 바람직하게는 (약) 0.05 내지 (약) 0.5 mg/ml의 농도로 존재한다.
- [0084] 바람직하게는 본 발명의 제형은 계면활성제를 함유한다. 계면활성제는 폴리소르베이트의 그룹, 특히 트윈 20 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트), 트윈 40 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노팔미테이트) 및 트윈 80 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노올레에이트)으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 가장 바람직한 것은 트윈 20이며, (약) 0.01 내지 (약) 10 mg/ml의 농도인 것이 바람직하다.
- [0085] 바람직한 구체예에서 본 발명의 제형은 적어도 25 μ g/ml의 r-hLH, 1.65 mg/ml의 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.104 mg/ml의 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 31.5 mg/ml의 아르기닌 모노히드로클로라이드, 0.05 mg/ml의 트윈 20, 0.5 mg/ml의 메티오닌 및 5 mg/ml의 페놀을 포함한다.
- [0086] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 제형은 적어도 25 μ g/ml의 r-hLH, 1.65 mg/ml의 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.104 mg/ml의 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28.5 mg/ml의 리신 모노히드로클로라이드, 0.05 mg/ml의 트윈 20, 0.5 mg/ml의 메티오닌 및 12 mg/ml의 벤질알코올을 포함한다.
- [0087] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 제형은 적어도 25 μ g/ml의 r-hLH, 1.65 mg/ml의 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.104 mg/ml의 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28.5 mg/ml의 리신 모노히드로클로라이드, 0.05 mg/ml의 트윈 20, 0.5 mg/ml의 메티오닌, 3 mg/ml의 벤질알코올 및 0.01 mg/ml의 벤즈알코늄 클로라이드를 포함한다.
- [0088] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 LH 또는 LH 변이체, 아르기닌, 리신 또는 이들의 혼합물이나 염의 군으로부터 선택된 안정화제, 및 벤질 알코올, 페놀, 및 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물로부터 선택된 정균제를 포함하는, 다중용량 사용을 위한 액체 약제 조성물을 제공한다.
- [0089] 추가로 바람직한 구체예에서, 본 발명은 LH 또는 LH 변이체, 아르기닌, 리신 또는 이들의 혼합물이나 염의 군으로부터 선택된 안정화제, 및 벤질 알코올, 페놀, 및 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물로부터 선택된 정균제, 및 WFI (주사용 증류수)의 수용액을 형성하는 것을 포함하여, 다중용량 사용을 위한 액체 약제 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0090] 여전히 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 LH 또는 LH 변이체, 아르기닌, 리신 또는 이들의 혼합물이나 염의 군으로부터 선택된 안정화제, 및 벤질 알코올, 페놀, 및 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물로부터 선택된 정균제를 포함하는 용액을 분배시키는 것을 포함하여, 패키징된 약제 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0091] 여전히 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 LH 또는 LH 변이체, 아르기닌, 리신 또는 이들의 혼합물이나 염의 군으로부터 선택된 안정화제, 및 벤질 알코올, 페놀, 및 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물로부터 선택된 정균제의 용액을 포함하는 바이알과, 그러한 용액이 첫 번째 사용 후 (약) 24시 또는 그 초과 기간 동안 보관될 수 있다고 써 있는 라벨을 포함하는, 사람 약제 용도를 위한 제품을 제공한다. 바람직하게는 상기 라벨에는 용액이 첫 번째 사용 후 (약) 12일 또는 14일까지 유지될 수 있다고 써 있다.
- [0092] 바이알 앰플 또는 카트리지의 밀봉을 뜯기 전인 첫 번째 사용 이전에, 본 발명의 제형은 적어도 (약) 6개월, 12개월 또는 24개월 동안 보관될 수 있다.

- [0093] 바람직한 저장 조건 하에, 제형은 첫 번째 사용 전에 밝은 광을 피해 (바람직하게는 그늘에서) 2-8℃ 또는 약 2-8℃의 온도, 보다 바람직하게는 4-5℃ 또는 약 4-5℃에서 보관된다.
- [0094] 상기 지시된 대로, 본 발명은 정균제를 함유하는, 단일 사용 및 다중용량 사용을 위한 LH 또는 LH 변이체의 액체 제형을 제공한다. 본 발명의 제형은 약제학적 또는 수의적 용도에 적합하다.
- [0095] 상기 지시된 대로, 바람직한 구체예에서, 본 발명은 패키징 물질과, LH 또는 LH 변이체, 아르기닌, 리신 또는 이들의 혼합물이나 염의 군으로부터 선택된 안정화제, 벤질 알코올, 페놀 및 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물로부터 선택된 정균제, 임의로 완충액 및/또는 다른 부형제의 용액을 수성 희석제에 포함하는 바이알을 포함하는 제품을 제공하고, 여기서 상기 패키징 물질은 그 제형이 첫 번째 사용 이후 24시간 또는 그 초과 기간 동안 보관될 수 있음을 나타내는 라벨을 포함한다.
- [0096] 바람직하게는 본 발명의 제형은 24개월 (첫 번째 사용 전)의 패키징 시간 동안 LH 활성의 적어도 80% 또는 약 80%를 보유한다. LH 활성은 래트 정낭 중량 증가 생체검정⁵을 이용하여 측정될 수 있다.
- [0097] 본 발명의 제형은 LH 또는 이의 변이체 및 안정량의 아르기닌 또는 이의 염 및/또는 리신 또는 이의 염, 및 임의로 벤질 알코올, 페놀 및 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물로부터 선택된 정균제를 고체로서 혼합시키거나, LH 또는 이의 변이체 및 안정량의 아르기닌 또는 이의 염 및/또는 리신 또는 이의 염, 및 임의로 벤질 알코올, 페놀 및 벤질알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물로부터 선택된 정균제를 수성 희석제에서 용해시킴에 의해 제조될 수 있다. 성분들을 혼합하거나 이들을 수성 희석제에서 용해시키는 것은 통상적인 용해 및 혼합 절차를 이용하여 수행된다. 적합한 제형을 제조하기 위해, 예를 들어 측정된 양의 LH 또는 LH 변이체를 완충된 용액에서 아르기닌 또는 이의 염 및/또는 리신 또는 이의 염 및 임의로 벤질 알코올, 페놀, 및 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물로부터 선택된 정균제와 완충된 용액에서 단백질, 아르기닌 또는 이의 염 및/또는 리신 또는 이의 염 및 임의의 정균제를 요망되는 농도로 제공하기에 충분한 양으로 조합시킨다. 이어서 생성된 용액을 바이알, 앰플 또는 카트리지에 분배시킨다. 이러한 공정의 변형이 당업자에 의해 인지될 것이다.
- [0098] 예를 들어, 추가의 첨가제가 사용되든지 간에 성분들을 첨가하는 순서, 제형이 제조되는 온도 및 pH는 모두 사용된 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.
- [0099] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 제형은 제형의 모든 성분들의 공지된 농도의 개개 원액을 제조하고 (예컨대, 완충액 소듐 포스페이트, 아르기닌 또는 이의 염 및/또는 리신 또는 이의 염, 트윈 20, 메티오닌, LH), 부피측정량을 분취시켜 동일한 조성물의 "모 용액"을 최종 제형으로서 형성함에 의해 제조된다. "모 용액"을 바람직하게는 Duropore® (밀리포어) 0.22 미크론 PDF 막을 통해 여과시켜 미생물을 제거한 다음 분취액을 바이알, 앰플 또는 카트리지와 같은 개개 컨테이너로 분배시킨다.
- [0100] 본 발명의 제형은 FSH 또는 FSH 변이체 (예컨대 Gonal-F®)를 포함하는 제형과 함께 사용될 수 있다.
- [0101] 본 발명의 제형은 인지된 장치를 이용하여 투여될 수 있다. 이러한 단일 바이알 시스템을 포함하는 예로는 EasyJect®, Gonal-F®Pen, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen® 및 Opt iPen®과 같은 용액 전달을 위한 펜-인젝터 장치가 있다.
- [0102] 본원에 청구된 제품은 패키징 물질을 포함한다. 패키징 물질은 규제청이 요구하는 정보 이외에, 제품이 사용될 수 있는 조건을 제공한다. 단일 바이알의 용액 제품의 경우, 라벨은 이러한 용액이 첫 번째 사용 후 24시간 또는 그 초과 기간 동안, 바람직하게는 12일 또는 14일 이내로 저장될 수 있음을 나타낸다. 본원에 제공된 제품은 사람 약제학적 제품용으로 유용하다.
- [0103] 하기 실시예는 단지 본 발명의 제형 및 조성물의 제조를 추가로 설명하기 위해 제공된다. 본 발명의 범위가 하기 실시예로 구성된 것으로만 해석되어서는 안된다.
- [0104] **실시예**

[0105]

물질

항목	제조사
r-hLH 벌크	Laboratoires Serono SA
L-아르기닌 모노히드로클로라이드	Merck code 1.01544
벤즈알코늄 클로라이드	Fluka code 12063
벤질 알코올	Merck code 1.00987
m-크레솔	Merck code 8.09691
L-글리신	Merck code 5.00190
L-리신 모노히드로클로라이드	Merck code 1.05701
메티오닌	Merck code 1.05707
페놀	Merck code 1.00200
오르토-인산 85% (Ph Eur, BP, NF)	Merck code 1.00563
수산화나트륨	Merck code 1.06498
인산수소이나트륨 일수화물	Merck code 1.06580
인산이수소나트륨 일수화물	Merck code 1.06346
무수 황산나트륨	Merck code 1.006649
소르비톨	Sigma code S-1876
사카로오스	Merck code 1.07653
트레할로오스	Merck code 1.08216
트윈 20	Merck code 8.22184
물	milliQ

[0106]

[0107] 하기 연구로부터 다수의 제형에 대한 다음 파라미터를 평가하였다:

[0108]

- 안정화제 및 정균제에 대한 조사

[0109]

- FSH 제형과의 상용가능성

[0110]

- 주요 패키징과의 상용가능성

[0111]

- 저장 후 안정성 프로파일

[0112]

제형은 액체 단일용량 및 다중용량 제형이었다. 하기 6개의 안정화제를 평가하였다:

[0113]

- L-아르기닌 모노히드로클로라이드 (실시예에서 ARG 또는 아르기닌)

[0114]

- L-리신 모노히드로클로라이드 (실시예에서 LYS 또는 리신)

[0115]

- 트레할로오스 (TRE)

[0116]

- L-글리신 (실시예에서 GLY 또는 글리신)

[0117]

- 사카로오스 (SAC)

[0118]

- 소르비톨 (SOR)

[0119]

하기 4개의 정균제를 다중용량 제형에 대해 평가하였다:

[0120]

- 벤질 알코올 (BA)

[0121]

- m-크레솔 (mCr)

[0122]

- 페놀 (Phe)

[0123]

- 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물 (BACL)

[0124]

실시예 1 - 단일용량 제형을 위한 안정화제에 대한 조사

[0125]

안정한 단일용량 제형을 전달하기 위한 6개의 안정화제 (사카로오스, 아르기닌, 글리신, 리신, 소르비톨 및 트레할로오스)를 시험하였다. 시험된 제형을 표 1에 요약한다.

[0126] 표 1. 상이한 안정화제를 함유하는 수 개의 r-hLH 단일용량 제형의 조성

성분 양 /ml	SAC/250	ARG/250	GLY/250	LYS/250	SOR/250	TRE/250
r-hLH 벌크	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg
메티오닌	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
트윈 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
사카로오스	105 mg	-	-	-	-	-
아르기닌	-	33 mg	-	-	-	-
글리신	-	-	23 mg	-	-	-
리신	-	-	-	28 mg	-	-
소르비톨	-	-	-	-	56,5 mg	-
트레할로오스	-	-	-	-	-	106 mg
WFI	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml

q.s. = 충분한 양

[0127]

[0128]

약 40 ml의 각 용액을 제조하고, 22 ml의 스테인레스 강 홀더에서 0.22 µm 막을 통해 여과시키고, 15 ml의 플라스틱 튜브에서 2-8℃, +25℃ 및 +40℃로 저장하였다. 용액을 단백질 함량 (SE-HPLC에 의해), 산화된 형태 (RP-HPLC에 의해), 응집물 (SE-HPLC에 의해) 및 서브유닛 형성 (정성적으로, SE-HPLC에 의해)에 대해 1개월 이내로 시험하였다. 상기 세트의 제형에 적용된 시험의 전체 패널의 결과를 표 2 내지 5에 기록한다.

[0129]

표 2. SE-HPLC에 의한 순도 (저장 온도:+40℃)

제형	이종이합체 %			유리-서브유닛 %			응집물 %		
	T=0	T=1d	T=4d	T=0	T=1d	T=4d	T=0	T=1d	T=4d
SAC/250	96,37	62,27	50,61	0,00	33,71	45,04	3,63	4,02	4,36
GLY/250	95,29	56,55	42,55	0,00	36,42	54,04	4,71	6,43	3,42
ARG/250	95,82	52,91	23,80	0,00	39,83	71,53	4,18	7,27	4,68
LYS/250	95,66	63,26	36,55	0,00	32,57	59,85	4,35	4,18	3,60
SOR/250	95,55	65,87	41,57	0,00	29,64	53,95	4,45	4,49	4,49
TRE/250	92,73	58,22	42,41	0,00	32,62	48,63	7,28	9,16	8,97

T =시간; d =일(들)

[0130]

[0131]

표 3. SE-HPLC에 의한 순도 (저장 온도:+25℃)

제형	이종이합체 %			유리-서브유닛 %			응집물 %		
	T=0	T=7d	T=1M	T=0	T=7d	T=1M	T=0	T=7d	T=1M
SAC/250	96,37	86,52	81,99	0,00	—	12,34	3,63	13,48	5,68
GLY/250	95,29	97,41	78,52	0,00	—	18,64	4,71	2,59	2,84
ARG/250	95,82	98,01	80,80	0,00	—	16,15	4,18	2,00	3,06
LYS/250	95,66	99,20	80,83	0,00	—	17,19	4,35	0,81	1,99
SOR/250	95,55	80,63	26,45	0,00	18,72	72,27	4,45	0,66	1,28
TRE/250	92,73	95,29	74,86	0,00	—	17,24	7,28	4,71	7,91

M = 월

[0132]

[0133]

표 4. RP-HPLC에 의한 산화된 형태%

제형	12 일 (+40℃)	1 개월 (+25℃)
SAC/250	7,62	21,84
GLY/250	7,46	n.a
ARG/250	6,26	9,59
LYS/250	6,68	4,90
SOR/250	6,62	24,58
TRE/250	19,95	10,45

n.a. = 입수불가능

[0134]

[0135]

표 5. SE-HPLC에 의한 r-hLH 함량

제형	T=0	T=1d (+40℃)	T=4d (+40℃)	T=0	T=1M (+25℃)
SAC/250	5,50	4,20	4,50	5,50	5,40
GLY/250	6,10	5,10	5,10	6,10	5,03
ARG/250	6,30	6,70	6,40	6,30	6,33
LYS/250	6,00	4,80	5,50	6,00	6,02
SOR/250	5,30	4,80	5,10	5,30	4,93
TRE/250	5,40	4,80	5,40	5,40	5,23

[0136]

[0137]

상기 결과에 기초하여, 사카로오스, 리신 및 아르기닌을 최선의 부형제로서 선택하였고, 이들은 항산화제로서 증가된 양 (250 µg/ml 및 500 µg/ml)의 메티오닌과의 상용가능성에 대해 추가로 조사된다. 시험된 용액의 조성을 표 6에 보고한다. 이러한 용액이 엑스 노보(ex novo) 제조되었음을 주목하여야 한다.

[0138] 표 6. 선택된 안정화제와 다양한 양의 메티오닌을 함유하는 r-hLH 단일용량 제형의 조성

성분 양 /ml	SAC/250	ARG/250	LYS/250	SAC/500	ARG/500	LYS/500
r-hLH 벌크	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg
메티오닌	250 µg	250 µg	250 µg	500 µg	500 µg	500 µg
트윈 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
사카로오스	105 mg	-	-	105 mg	-	-
아르기닌	-	33 mg	-	-	33 mg	-
리신	-	-	28 mg	-	-	28 mg
WFI	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml

[0139]

[0140]

약 100 ml의 각 용액을 제조하고, 22 ml의 스테인레스 강 홀더에서 0.22 µm 막을 통해 여과시키고, 1 ml의 유리 주사기에 충전시켜 약물과 최종 컨테이너 (1 ml 유리 주사기 + 플런저)간 상용가능성을 또한 시험하였다. 주사기를 2-8℃, +25℃, +33℃ 및 +40℃에서 저장하였다. +33℃ 저장 온도를 도입하여 매우 빠른 (+40℃) 및 매우 느린 (+25℃) 분해 동역학을 절충하도록 하였다. 용액을 r-hLH 함량 (SE-HPLC에 의해), 산화된 형태 (RP-HPLC에 의해), 응집물 (SE-HPLC에 의해) 및 서브유닛 형성 (정성적으로, SE-HPLC에 의해)에 대해 2-3개월 이내로 시험하였다.

[0141]

표 6에 개시되어 있는 제형에 적용된 시험의 전체 패널의 결과를 표 7 내지 11에 기록한다.

[0142]

표 7. SE-HPLC에 의한 순도 (저장 온도: +40℃)

제형	이종이합체 %		유리-서브유닛 %		응집물 %		이종이합체 % (2-8℃)	
	T=0	T=4d	T=0	T=4d	T=0	T=4d	T=0	T=13w
SAC/250	99,12	38,98	—	60,29	0,89	0,74	99,12	97,96
ARG/250	98,30	9,16	—	90,03	1,70	0,83	98,30	99,23
LYS/250	98,59	18,27	—	81,02	1,41	0,72	98,59	99,69
SAC/500	99,34	33,96	—	64,11	0,66	1,93	99,34	98,66
ARG/500	98,41	13,49	—	85,94	1,59	0,57	98,41	99,36
LYS/500	98,72	29,07	—	69,89	1,22	1,05	98,72	99,68

w = 주

[0143]

[0144]

표 8. SE-HPLC에 의한 순도 (저장 온도: +33℃)

제형	이종이합체 %					유리-서브유닛 %				
	T=0	T=6d	T=4w	T=6w	T=8w	T=0	T=6d	T=4w	T=6w	T=8w
SAC/250	99,12	69,75	65,46	64,82	n.a.	—	29,25	46,04	32,49	n.a.
ARG/250	98,30	65,03	39,69	37,00	31,37	—	32,20	58,05	61,22	63,90
LYS/250	98,52	74,96	53,95	46,28	43,23	—	23,59	44,42	52,58	55,09

[0145]

제형	이종이합체 %					유리-서브유닛 %				
	T=0	T=6d	T=4w	T=6w	T=8w	T=0	T=6d	T=4w	T=6w	T=8w
SAC/500	99,34	71,26	43,14	27,77	n.a.	—	27,12	50,74	52,34	n.a.
ARG/500	98,41	67,04	38,04	32,62	25,34	—	31,14	58,48	65,37	70,81
LYS/500	98,72	74,03	52,81	49,17	43,88	—	24,88	45,07	49,04	53,24
제형	응집물 %									
	T=0	T=6d	T=4w	T=6w	T=8w					
SAC/250	0,89	1,01	n.a.	n.a.	n.a.					
ARG/250	1,70	2,77	2,26	1,79	4,74					
LYS/250	1,41	1,45	1,64	1,14	1,69					
SAC/500	0,66	1,63	19,90	6,12	n.a.					
ARG/500	1,59	1,83	3,48	2,02	3,86					
LYS/500	1,22	1,09	2,12	1,79	2,85					

[0146]

표 9. SE-HPLC에 의한 순도 (저장 온도: +25℃)

제형	이종이합체 %			유리-서브유닛 %			응집물 %		
	T=0	T=4w	T=8w	T=0	T=4w	T=8w	T=0	T=4w	T=8w
SAC/250	99,12	98,36	76,81	—	—	21,05	0,89	1,65	2,15
ARG/250	98,30	79,80	73,39	—	17,89	23,99	1,70	2,32	2,63
LYS/250	98,59	84,15	77,60	—	13,78	21,23	1,41	n.a.	1,18
SAC/500	99,34	n.a.	61,24	—	n.a.	33,50	0,66	n.a.	5,26
ARG/500	98,41	n.a.	69,45	—	n.a.	27,93	1,59	n.a.	2,63
LYS/500	98,72	n.a.	78,56	—	n.a.	19,81	1,22	n.a.	1,64

표 10. RP-HPLC에 의한 산화된 형태%

제형	4 일 (+40°C)	8 주 (+25°C)	4 주 (+33°C)	6 주 (+33°C)
SAC/250	6,13	7,32	9,72	20,13
SAC/500	17,37	35,78	39,12	45,93
ARG/250	6,29	5,96	9,72	7,02
ARG/500	4,69	5,67	6,69	8,10
LYS/250	5,24	5,05	8,00	8,63
LYS/500	3,25	4,02	5,71	6,84

표 11. SE-HPLC에 의한 r-hLH 함량

제형	T=0	T=4 일 (+40°C)	T=8 주 (+25°C)	T=4 주 (+33°C)	T=6 주 (+33°C)	T=8 주 (+33°C)
SAC/250	5,03	3,09	5,09	5,31	4,74	n.a.
SAC/500	6,27	4,92	6,00	5,96	5,63	6,20
ARG/250	5,90	3,74	5,50	5,63	5,34	5,17
ARG/500	5,00	3,36	4,25	5,05	n.a.	n.a.
LYS/250	6,14	4,54	5,74	5,83	5,58	5,84
LYS/500	6,08	3,91	5,61	5,73	5,49	5,48

이러한 결과에 기초하여, 사카로오스는 250 µg/ml의 메티오닌과 높은 상용가능성을 나타내었고, 리신은 500 µg/ml의 메티오닌과 그리고 아르기닌은 두 농도 모두의 메티오닌과 높은 상용가능성을 나타내었다.

실시예 2 - r-hLH 단일용량 액체 제형과 FSH 다중용량 액체 제형의 상용가능성

실시예 1에 기재된 결과에 비추어, 표 6에 개시된 제형을 FSH 제형 (즉, Gonal-F® 다중용량 액체 제형)과 혼합시키고 25℃에서 24시간 접촉시킨 후에 하기 방법에 따라 시험하였다:

- r-hFSH 및 r-hLH α-서브유닛 산화된 형태에 대해 RP-HPLC (표 12에서 순도% 아래에 비산화된 형태가 보고된 다)
- 응집물 정량에 대해 SE-HPLC
- r-hFSH 및 r-hLH 역가에 대해 RP-HPLC
- r-hFSH 및 r-hLH 생체내 생체검정
- r-hFSH 및 r-hLH 유리-서브유닛 및 응집물 정량에 대해 SDS-PAGE (데이터는 보고되지 않음)
- 시각적 외형.

이 결과를 표 12 내지 14에 기록한다.

표 12. RP-HPLC에 의한 순도 및 SE-HPLC에 의한 응집물%

제형	순도 %		응집물 %	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/250	98,53	98,61	0,00	0,00
ARG/250	97,29	99,17	0,00	0,72
LYS/250	97,81	97,73	0,00	0,37
SAC/500	98,50	98,17	0,00	0,39
ARG/500	97,75	97,47	0,00	0,69
LYS/500	97,04	96,74	0,00	0,33

h = 시간

표 13. FSH 및 LH 함량

제형	r-hFSH 함량 *		r-hLH 함량 #	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/250	16,14	16,14	3,67	3,61
ARG/250	15,45	16,01	4,15	4,21
LYS/250	15,35	15,68	4,07	4,15
SAC/500	16,29	16,91	3,71	3,70
ARG/500	16,03	15,80	4,15	4,05
LYS/500	15,46	15,69	4,05	4,17

* FSH 이온치 : 200 IU=15,48 µg/ml; # LH 이온치 : 100 IU=4 µg/ml

표 14. 생체검정

제형	r-hFSH 활성		r-hLH 활성	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/250	174,60	183,70	108,00	109,00

시험된 모든 단일용량 제형은 다음과 같이 Gonal-F® 다중용량 제형과 상용가능하였다:

- FSH 및 LH 함량에서 손실 없음,
- 산화되지 않음,
- 응집 및 유리-서브유닛 분리 없음 (SDS-PAGE에 의해),
- LH 및 FSH 생활성의 손실 없음.

실시예 3 - 단일용량 액체 제형의 안정성 연구

이전 실시예의 결과에 기초하여, 아르기닌을 함유하는 것들을 제외한 표 6에 개시된 제형을 두 상이한 r-hLH 농도 (6 µg/ml 및 12 µg/ml)에서 제조하였고, 이것을 2-8℃ 및 +25℃에 저장하고, 엄격한 안정성 플랜 및 하기 분석 방법에 따라 시험하였다:

- LH 함량에 대해 RP-HPLC
- α-서브유닛 산화된 형태에 대해 RP-HPLC
- 유리-서브유닛 및 응집물에 대해 SDS-PAGE
- 생체검정
- 용액의 pH
- 시각적 외형

모든 파라미터의 결과에 대해 통계적 분석을 수행하였고, 스태빌레오(Stabileo) 1.1 소프트웨어의 도움으로 안정성을 나타낸 것으로 확인되었다.

2-8℃ 및 25±2℃에서 저장시 r-hLH 농도 (RP-HPLC에 의해)

어떤 r-hLH 농도에서도 (6 µg/ml 및 12 µg/ml) 2-8℃에서 6-개월 저장한 후에 단백질 농도에 있어서 어떠한 통계적으로 유의한 손실도 제형에 대해 관찰되지 않았다. 25±2℃에서 6-개월 저장 후 0.4 µg/월의 보통의 감소가 관찰되었다.

2-8℃ 및 25±2℃에서 저장시 r-hLH 생활성 (생체검정)

어떤 r-hLH 농도에서도 (6 µg/ml 및 12 µg/ml) 2-8℃ 및 25±2℃에서 6-개월 저장한 후에 생체활성의 관련 손실이 제형에 대해 관찰되지 않았다.

SDS-PAGE에 의한 서브유닛 및 응집물%

SDS-PAGE에 의한 응집물의 비율은 2-8℃ 및 25℃에서 6-개월 저장 후에 두 농도 모두에서 2% 미만으로 유지되었다. SDS-PAGE에 의한 서브유닛의 비율은 2-8℃에서 6-개월 저장 후에 두 농도 모두에서 2% 미만으로 유지되었다. 25±2℃에서 6-개월 저장 후에 약 5%/월의 보통의 감소가 관찰되었다.

RP-HPLC에 의한 산화된 형태%

[0190] 약 0.4%/월의 증가가 2-8℃에서 6-개월 저장 후에 측정되었고 25±2℃에서는 0.6-1.4%/월 범위의 증가가 측정되었다.

[0191] pH 및 외형

[0192] 제조 동안과 저장시에 외형 (색, 투명성, 가시적 입자) 및 pH에 있어서 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.

[0193] 실시예 4 - 다중용량 제형에 대한 안정화제 및 정균제의 상용가능성

[0194] 6개의 안정화제 (사카로오스, 아르기닌, 글리신, 리신, 소르비톨 및 트레할로오스)를 안정한 다중용량 제형을 전달하기 위한 정균제와의 상용가능성에 대해 시험하였다. 시험된 제형을 표 15에 요약한다.

[0195] 표 15. 안정화제 및 정균제의 다양한 조합물을 함유하는 여러 r-hLH 다중용량 제형의 조성

성분 양 /ml	SAC/250 BA	SAC/250 mCr	SAC/250 Phe	ARG/250 BA	ARG/250 mCr	ARG/250 Phe
r-hLH 벌크	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg
메티오닌	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
트윈 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
사카로오스	105 mg	105 mg	105 mg	-	-	-
아르기닌	-	-	-	33 mg	33 mg	33 mg
벤질 알코올	0.90%	-	-	0.90%	-	-
m-크레솔	-	0.30%	-	-	0.30%	-
페놀	-	-	0.50%	-	-	0.50%
WFI	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml

[0196]

성분 양 /ml	LYS/250 BA	LYS/250m Cr	LYS/250 Phe	SOR/250 BA	SOR/250 mCr	SOR/250 Phe
r-hLH 벌크	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg
메티오닌	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
트윈 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
리신	28 mg	28 mg	28 mg	-	-	-
소르비톨	-	-	-	56.5 mg	56.5 mg	56.5 mg
벤질 알코올	0.90%	-	-	0.90%	-	-
m-크레솔	-	0.30%	-	-	0.30%	-
페놀	-	-	0.50%	-	-	0.50%
WFI	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml

성분 양 /ml	GLY/250/ BA	GLY/250/ mCr	GLY/250/ Phe	TRE/250/ BA	TRE/250/ mCr	TRE/250/ Phe
r-hLH 벌크	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg
메티오닌	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
트윈 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
글리신	23 mg	23 mg	23 mg	-	-	-
트레할로오스	-	-	-	106 mg	106 mg	106 mg
벤질 알코올	0.90%	-	-	0.90%	-	-
m-크레솔	-	0.30%	-	-	0.30%	-
페놀	-	-	0.50%	-	-	0.50%
WFI	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml

[0197]

[0198] 약 40 ml의 각 용액을 제조하고, 0.22 µm 막을 통해 여과하고, 15 ml의 플라스틱 튜브에 2-8℃, +25℃ 및 +40℃로 저장하였다. 용액을 단백질 함량 (크기 배제-HPLC, SE-HPLC에 의해, 데이터는 제시되지 않음), 산화된 형태 (역상-HPLC, RH-HPLC에 의해), 응집물 (SE-HPLC에 의해) 및 서브유닛 형성 (정성적으로, SE-HPLC에 의해)에 대해 1개월 이내로 시험하였다. 이러한 제형의 세트에 적용된 시험의 모든 패널의 결과를 표 16 내지 18에 보고한다. m-크레솔 (mCr)을 함유하는 모든 용액조차도 정균제와 계면활성제 (트윈 20)간 상용불가능함으로 인해 제조 직후에 유백광을 나타내었다.

[0199]

표 16. SE-HPLC에 의한 순도 (저장 온도: +40℃)

제형	이종이합체 %			유리-서브유닛 %			응집물 %		
	T=0	T=1d	T=4d	T=0	T=1d	T=4d	T=0	T=1d	T=4d
SAC/250/mCr	98,91	89,61	52,93	—	n.a.	23,67	1,10	10,38	23,41
SAC/250/BA	95,50	74,04	51,52	—	22,65	45,12	4,50	3,33	3,36
SAC/250/Phe	98,34	74,20	67,13	—	19,63	23,71	1,66	5,57	9,17
GLY/250/mCr	97,95	96,54	86,76	—	9,55	n.a.	2,05	3,14	n.a.
GLY/250/BA	96,08	59,58	41,59	—	37,82	56,45	3,92	2,61	1,97
GLY/250/Phe	96,49	74,71	86,06	—	20,01	9,22	2,51	5,28	4,73
ARG/250/mCr	97,94	70,34	44,39	—	28,39	53,33	2,06	1,29	2,29
ARG/250/BA	91,44	35,99	15,91	—	58,99	79,65	8,57	5,03	4,45
ARG/250/Phe	95,31	63,27	29,12	—	33,75	67,18	4,69	2,98	3,70

[0200]

제형	이종이합체 %			유리-서브유닛 %			응집물 %		
	T=0	T=1d	T=4d	T=0	T=1d	T=4d	T=0	T=1d	T=4d
LYS/250/mCr	98,19	81,57	65,68	—	17,99	33,10	1,81	n.a.	1,22
LYS/250/BA	94,75	47,94	33,61	—	48,59	63,14	5,26	3,48	3,26
LYS/250/Phe	97,91	72,68	56,73	—	26,18	42,26	2,09	1,16	1,01
SOR/250/mCr	90,46	86,33	58,78	—	n.a.	18,87	9,55	13,68	22,36
SOR/250/BA	94,08	62,71	45,27	—	64,17	47,22	5,93	3,13	7,52
SOR/250/Phe	94,74	70,58	55,75	—	22,30	32,76	5,26	7,13	11,50
TRE/250/mCr	86,07	77,26	40,60	—	n.a.	20,87	13,93	22,74	38,53
TRE/250/BA	94,74	69,53	42,19	—	21,36	44,22	5,26	9,12	12,88
TRE/250/Phe	91,05	85,29	54,89	—	n.a.	24,28	8,95	14,72	20,83

[0201]

[0202]

표 17. SE-HPLC에 의한 순도 (저장 온도: +25℃)

제형	이종이합체 %			유리-서브유닛 %			응집물 %		
	T=0	T=7d	T=1M	T=0	T=7d	T=1M	T=0	T=7d	T=1M
SAC/250/mCr	98,91	53,76	69,30	—	31,19	15,13	1,10	14,34	15,57
SAC/250/BA	95,50	95,04	75,84	—	—	14,66	4,50	4,96	9,50
SAC/250/Phe	98,34	93,82	85,49	—	—	—	1,66	6,18	14,51
GLY/250/mCr	97,95	97,00	95,39	—	—	—	2,05	3,00	4,62
GLY/250/BA	96,08	97,63	68,21	—	—	28,42	3,92	2,37	2,17
GLY/250/Phe	96,49	97,44	93,19	—	—	—	2,51	2,57	6,10
ARG/250/mCr	97,94	98,73	78,33	—	—	19,73	2,06	1,28	1,94
ARG/250/BA	91,44	97,38	79,79	—	—	18,91	8,57	2,63	1,31
ARG/250/Phe	95,31	98,33	82,18	—	—	16,59	4,69	1,67	1,23
LYS/250/mCr	98,19	98,28	95,38	—	—	—	1,81	1,73	4,27
LYS/250/BA	94,75	97,39	82,54	—	—	14,66	5,26	2,61	2,80
LYS/250/Phe	97,91	99,55	98,61	—	—	—	2,09	0,46	1,40
SOR/250/mCr	90,46	82,65	64,24	—	—	—	9,55	17,23	35,76
SOR/250/BA	94,08	95,93	68,59	—	—	21,99	5,93	4,08	9,43
SOR/250/Phe	94,74	92,55	81,96	—	—	—	5,26	7,46	18,05
TRE/250/mCr	86,07	75,78	45,61	—	—	—	13,93	24,23	54,40
TRE/250/BA	94,74	91,22	67,28	—	—	13,75	5,26	8,79	18,97
TRE/250/Phe	91,05	84,53	66,79	—	—	—	8,95	15,47	33,22

[0203]

[0204]

표 18. RP-HPLC에 의한 산화된 형태%

제형	12 일 (+40℃)	1 개월 (+25℃)
SAC/250/mCr	51,14	16,62
SAC/250/BA	14,07	8,83
SAC/250/Phe	25,55	17,54
GLY/250/mCr	59,29	5,43
GLY/250/BA	10,53	4,44
GLY/250/Phe	34,86	16,06
ARG/250/mCr	65,27	3,13
ARG/250/BA	7,12	5,65
ARG/250/Phe	15,49	11,27
LYS/250/mCr	44,05	16,36
LYS/250/BA	13,69	9,30
LYS/250/Phe	56,55	17,86
SOR/250/mCr	58,29	25,68
SOR/250/BA	13,51	8,49
SOR/250/Phe	30,78	17,75
TRE/250/mCr	45,84	26,36
TRE/250/BA	19,12	11,41
TRE/250/Phe	23,87	27,76

[0205]

[0206]

상기 결과에 기초하여, 사카로오스, 리신 및 아르기닌을 최선의 부형제로서 선택하였고, 이들은 증가된 양 (500 µg/ml)의 메티오닌과의 상용가능성에 대해 추가로 조사된다. 벤질 알코올, 페놀, 및 벤질 알코올과 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물을 정균제로서 선택하였다. 시험된 제형을 표 19에 요약한다.

표 19. 선택된 안정화제 및 다양한 정균제를 함유하는 여러 r-hLH 다중용량 제형의 조성

성분 양 /ml	SAC/500 BA	SAC/500 BACL	SAC/500 Phe	ARG/500 BA	ARG/500 BACL	ARG/500 Phe
r-hLH 벌크	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg	1.65 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg	0.104 mg
메티오닌	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg
트윈 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
사카로오스	105 mg	105 mg	105 mg	-	-	-
아르기닌	-	-	-	33 mg	33 mg	33 mg
벤질 알코올	1.2%	0.30%	-	1.2%	0.30%	-
벤즈알코늄 클로라이드	-	0.001%	-	-	0.001%	-
페놀	-	-	0.50%	-	-	0.50%
WFI	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml	q.s. to 1 ml
성분 양 /ml	LYS/500/BA		LYS/500/BACL		LYS/500/Phe	
r-hLH 벌크	25 µg		25 µg		25 µg	
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg		1.65 mg		1.65 mg	
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg		0.104 mg		0.104 mg	
메티오닌	500 µg		500 µg		500 µg	
트윈 20	50 µg		50 µg		50 µg	
리신	28 mg		28 mg		28 mg	
벤질 알코올	1.2%		0.30%		-	
벤즈알코늄 클로라이드	-		0.001%		-	
페놀	-		-		0.50%	
WFI	q.s. to 1 ml		q.s. to 1 ml		q.s. to 1 ml	

약 100 ml의 각 용액을 제조하고, 0.22 µm 막을 통해 여과하고, 3 ml의 카트리지에 충전하였다. 하기 주요 패키징을 이용하였다:

- 실리코화된 3 ml 유리 카트리지 (Nuova Ompi)
- 크립프 캡 코드 CAP J 3ML L1H075-1-H1B-FM 257/2 (Helvoet Pharma)
- 코팅된 플런저: Helvoet V9282 FM257/2 Omniflex 코팅됨.

카트리지는 단백질 함량 (SE-HPLC에 의해), 산화된 형태 (RH-HPLC에 의해), 응집물 (SE-HPLC에 의해) 및 서브유닛 형성 (정성적으로, SE-HPLC에 의해)에 대해 시험되는 2-8°C, +25°C 및 +40°C에 2개월 내로 저장되었다.

이러한 두 번째 세트의 제형에 적용된 시험의 전체 패널의 결과를 표 20 내지 26에 보고한다.

표 20. SE-HPLC에 의한 순도 (저장 온도: +40°C)

제형	이종이합체 %		유리-서브유닛 %		응집물 %	
	T=0	T=3 일	T=0	T=3 일	T=0	T=3 일
SAC/500/BA	100,00	60,01	—	39,55	—	0,44
SAC/500/BACL	100,00	67,39	—	32,34	—	0,27
SAC/500/Phe	99,66	65,01	—	31,27	0,34	3,72
ARG/500/BA	99,91	45,63	—	54,65	0,10	—
ARG/500/BACL	99,93	44,67	—	55,33	0,07	—
ARG/500/Phe	99,93	61,97	—	38,03	0,08	—
LYS/500/BA	99,93	61,71	—	38,30	0,08	—
LYS/500/BACL	99,95	61,33	—	38,68	0,06	—
LYS/500/Phe	99,93	76,03	—	23,59	0,08	0,39

표 21. SE-HPLC에 의한 순도 (저장 온도: +33°C)

제형	이종이합체 %				유리-서브유닛 %			응집물 %	
	T=0	T=3w	T=4w	T=8w	T=0	T=3w	T=4w	T=0	T=3w
SAC/500/BA	100,00	76,56	71,22	59,22	—	22,03	26,35	/	1,43
SAC/500/BACL	100,00	81,49	78,95	63,53	—	17,26	20,10	/	1,26
SAC/500/Phe	99,66	76,24	67,13	51,10	—	14,26	18,03	0,34	9,51
ARG/500/BA	99,91	71,90	71,52	61,41	—	27,89	27,73	0,10	0,21
ARG/500/BACL	99,93	69,08	66,86	57,22	—	30,67	32,94	0,07	0,26
ARG/500/Phe	99,93	86,11	76,74	75,51	—	13,76	22,55	0,08	0,14
LYS/500/BA	99,93	83,09	76,72	67,30	—	16,76	22,50	0,08	0,16
LYS/500/BACL	99,95	81,03	75,21	70,20	—	18,88	24,64	0,06	0,09
LYS/500/Phe	99,93	87,29	80,51	68,85	—	12,10	18,53	0,08	0,62

[0219] 표 22. SE-HPLC에 의한 순도 (저장 온도: +25℃)

제형	이종이합체 %			유리-서브유닛 %		응집물 %
	T=0	T=4w	T=8w	T=0	T=4w	
SAC/500/BA	100,00	83,85	82,87	—	14,69	—
SAC/500/BACL	100,00	86,30	85,78	—	13,06	—
SAC/500/Phe	99,66	79,35	75,26	—	13,39	0,34
ARG/500/BA	99,91	82,32	82,13	—	17,39	0,10
ARG/500/BACL	99,93	80,42	80,77	—	19,25	0,07
ARG/500/Phe	99,93	84,59	80,95	—	15,13	0,08
LYS/500/BA	99,93	85,04	85,10	—	13,78	0,08
LYS/500/BACL	99,95	84,24	86,22	—	15,42	0,06
LYS/500/Phe	99,93	85,41	81,22	—	13,68	0,08

[0220]
[0221] 표 23. RP-HPLC에 의한 산화된 형태% (저장 온도: +33℃)

제형	T=0	T=3 주	T=8 주	T=13 주
SAC/500/BA	1,12	5,21	4,21	4,26
SAC/500/BACL	0,90	5,59	4,90	4,46
SAC/500/Phe	0,99	8,28	6,01	16,14
ARG/500/BA	0,69	4,52	4,13	2,65
ARG/500/BACL	1,13	4,57	3,57	2,97
ARG/500/Phe	0,94	4,60	5,24	4,82
LYS/500/BA	1,53	5,71	16,34	8,77
LYS/500/BACL	1,60	4,49	5,83	5,70
LYS/500/Phe	0,66	9,66	34,97	25,51

[0222]
[0223] 표 24. RP-HPLC에 의한 산화된 형태% (저장 온도: +25℃)

제형	T=0	T=4 주	T=8 주	T=13 주
SAC/500/BA	1,12	2,04	2,19	2,44
SAC/500/BACL	0,90	2,10	2,31	2,23
SAC/500/Phe	0,99	2,68	5,72	7,50
ARG/500/BA	0,69	1,40	1,61	1,65
ARG/500/BACL	1,13	1,46	2,31	1,89
ARG/500/Phe	0,94	1,31	2,77	2,35
LYS/500/BA	1,53	2,51	3,35	4,73
LYS/500/BACL	1,60	1,96	3,14	3,47
LYS/500/Phe	0,66	4,05	11,38	22,52

[0224]
[0225] 표 25. RP-HPLC에 의한 산화된 형태%

제형	T=0	T=13 주 (+5℃)	T=0	T=3 일 (+40℃)
SAC/500/BA	1,12	1,11	1,12	1,16
SAC/500/BACL	0,90	1,29	0,90	1,25
SAC/500/Phe	0,99	2,51	0,99	1,47
ARG/500/BA	0,69	1,03	0,69	0,64
ARG/500/BACL	1,13	1,16	1,13	1,06
ARG/500/Phe	0,94	2,02	0,94	1,47
LYS/500/BA	1,53	2,03	1,53	1,84
LYS/500/BACL	1,60	1,56	1,60	1,58
LYS/500/Phe	0,66	n.a.	0,66	3,10

[0226]
[0227] 표 26. SE-HPLC에 의한 r-hLH 함량

제형	T=0	T=3d (+40℃)	T=3w (+33℃)	T=4w (+33℃)	T=8w (+33℃)	T=4w (+25℃)	T=8w (+25℃)
SAC/500/BA	20,38	21,70	21,05	22,54	16,47	23,70	18,43
SAC/500/BACL	21,73	22,06	21,31	22,64	18,77	23,65	18,10
SAC/500/Phe	21,24	21,49	21,02	22,53	20,71	22,66	17,23
ARG/500/BA	22,23	18,86	19,52	24,64	16,14	25,26	17,69
ARG/500/BACL	22,38	21,48	21,71	23,52	16,86	24,18	19,34
ARG/500/Phe	21,34	22,38	20,60	23,09	16,99	24,41	16,32
LYS/500/BA	20,33	20,93	18,85	22,10	14,93	24,24	17,36
LYS/500/BACL	23,83	21,78	20,68	23,44	15,50	24,07	18,60
LYS/500/Phe	21,34	21,05	20,20	21,89	16,50	22,99	16,56

[0228]
[0229] 상기 결과는 안정화제와 증가된 양의 메티오닌의 상용가능성을 확인시켜 준다 (실시에 1 참조). 또한 상기 결과는 평균제가 500 μg/ml의 메티오닌과 상용가능함을 나타내었다.

[0230] 실시예 5 - r-hLH 다중용량 액체 제형과 FSH 다중용량 액체 제형의 상용가능성

[0231] 실시예 4의 결과에 기초하여, 3 ml 카트리지의 r-hLH의 제형을 FSH 제형 (즉 Gonat-F® 다중용량 액체 제형)과

혼합시키고 25℃에서 24시간 접촉시킨 후에 하기 방법에 따라 시험하였다.

- 순도에 대해 SE-HPLC,
- r-hFSH 및 r-hLH 역가에 대해 RP-HPLC,
- r-hFSH 및 r-hLH α-서브유닛 산화된 형태에 대해 RP-HPLC,
- r-hFSH 및 r-hLH 생체내 생체검정,
- r-hFSH 및 r-hLH 유리-서브유닛 및 응집물 정량을 위한 SDS-PAGE (데이터는 보고되지 않음),
- 용액의 pH,
- 시각적 외형.

이 결과를 표 27 내지 29에 보고한다.

표 27. SE-HPLC에 의한 순도

제형	이종이합체 %		응집물 %	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/500/BA	98,28	98,41	0,30	1,09
SAC/500/BACL	98,85	99,66	0,00	0,43
SAC/500/Phe	98,18	97,68	0,27	0,54
ARG/500/BA	98,31	98,61	0,28	0,98
ARG/500/BACL	97,68	98,52	0,33	0,53
ARG/500/Phe	97,89	97,73	0,44	0,77
LYS/500/BA	97,35	97,51	0,38	1,09
LYS/500/BACL	97,97	98,82	0,28	0,81
LYS/500/Phe	98,29	98,40	0,37	1,01

표 28. FSH 및 LH 함량

제형	r-hFSH 함량 *		r-hLH 함량 #	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/500/BACL	29,50	31,15	7,20	8,31
SAC/500/Phe	30,88	31,28	7,34	7,54
ARG/500/BA	30,46	31,00	8,02	8,44
ARG/500/BACL	32,23	32,84	7,12	7,40
ARG/500/Phe	30,07	31,06	7,78	8,05
LYS/500/BA	30,91	32,11	6,88	7,25
LYS/500/BACL	28,57	31,66	6,64	7,62
LYS/500/Phe	28,75	31,25	6,80	7,47

* FSH 이온치 : 200 IU=30,96 µg/ml; # LH 이온치 : 100 IU=8 µg/ml

표 29. 생체검정

제형	r-hFSH 활성		r-hLH 활성	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/500/BACL	365,7	355,0	227,0	212,7
ARG/500/Phe	387,5	393,0	231,4	243,0

시험된 모든 다중용량 제형은 다음과 같이 Gonal-F® 다중용량 제형과 상용가능하였다:

- FSH 및 LH 함량에서 손실 없음,
- 산화되지 않음,
- 응집 없음 (SE-HPLC에 의해),
- SDS-PAGE에 의해 응집물 및 서브유닛 형성되지 않음,
- LH 및 FSH 생활성의 손실 없음.

실시예 6 - 주요 패키징과의 상용가능성

r-hLH 제형과 최종 컨테이너 (주사기 및 카트리지)간 상용가능성을 시험하기 위해, 하기 파라미터를 시험하는 매트릭스 연구를 설정하였다:

- r-hLH 농도의 효과: 6 µg/ml, 12 µg/ml, 24 µg/ml,

- [0255] - 충전 부피의 효과: 0.25 ml, 0.5 ml, 1 ml,
- [0256] - 컨테이너의 유형: 1 ml 유리 주사기 및 3 ml 유리 카트리지,
- [0257] - 정균제의 효과: 정균제를 사용 및 사용하지 않고 제조된 제형을 3 ml 카트리지에 저장.
- [0258] 한 제형 (SAC/500/BACL)을 상이한 r-hLH 세기에서 제조하고 다양한 충전 부피로 컨테이너에 채웠다. 배치를 SE-HPLC에 의해 1주일 이내로 +33°C에서 정성적으로 비교하였다. 이 결과를 도 1에 보고한다 (A-F). 도 2에서 (A-B), 정균제의 조합물을 지닌 제형과 지니지 않은 제형 상에서 이중이합체의 비율을 SE-HPLC에 의해 비교하였다.
- [0259] 도 1 및 2의 결과를 보면, 하기 결론을 도출할 수 있다:
- [0260] - 12 µg/ml 및 24 µg/ml에서 제형에 대한 컨테이너의 영향 없음
- [0261] - 12 µg/ml 및 24 µg/ml에서 제형에 대한 충전 부피의 영향 없음
- [0262] - 서브유닛 분리에 대한 증가된 농도의 양성 효과
- [0263] - 정균제가 있는 배치와 정균제가 없는 배치간 차이 없음
- [0264] - 더 높은 안정성은 보다 높은 r-hLH 농도와 관련됨.
- [0265] **실시예 7 - 다중용량 액체 제형의 안정성 연구**
- [0266] 이전 실시예의 결과에 기초하여, 표 19에 개시된 4개의 제형 (SAC/500/BACL, LYS/500/BA, LYS/500/BACL 및 ARG/500/Phe)을 2-8°C 및 +25°C에 저장하고 엄격한 안정성 플랜 및 하기 분석 방법에 따라 시험하였다:
- [0267] - LH 함량에 대해 RP-HPLC
- [0268] - α-서브유닛 산화된 형태에 대해 RP-HPLC
- [0269] - 페놀 함량에 대해 RP-HPLC
- [0270] - 벤즈알코늄 클로라이드 함량에 대해 RP-HPLC
- [0271] - 벤질 알코올 함량에 대해 RP-HPLC
- [0272] - 유리-서브유닛과 응집물에 대해 SDS-PAGE
- [0273] - 생체검정
- [0274] - 용액의 pH
- [0275] - 시각적 외형
- [0276] 상기 제형 중 리신 및 아르기닌의 양은 제형의 등장성을 최적화하도록 조정되었다 (즉 L-리신 모노히드로클로라이드는 28.5 mg으로 그리고 L-아르기닌 모노히드로클로라이드는 31.5 mg으로).
- [0277] 모든 파라미터의 결과에 대해 통계적 분석을 수행하였고, 스타빌레오 1.1 소프트웨어의 도움으로 안정성을 나타낸 것으로 확인되었다.
- [0278] *2-8°C 및 25±2°C에서 저장시 r-hLH 농도 (RP-HPLC에 의해)*
- [0279] 2-8°C에서 12-개월 저장한 후에 단백질 농도에 있어서 어떠한 통계적으로 유의한 손실도 제형에 대해 관찰되지 않았다. 25±2°C에서 6-개월 저장 후 0.4 µg/월의 보통의 감소가 관찰되었다.
- [0280] *2-8°C 및 25±2°C에서 저장시 r-hLH 생활성 (생체검정)*
- [0281] 2-8°C 및 25±2°C에서 12-개월 저장한 후에 생체활성의 어떠한 관련 손실도 제형에 대해 관찰되지 않았다.
- [0282] *SDS-PAGE에 의한 서브유닛 및 응집물%*
- [0283] SDS-PAGE에 의한 응집물의 비율은 2-8°C 및 25°C에서 12-개월 저장 후에 모든 제형에 대해 2% 미만으로 유지되었다. SDS-PAGE에 의한 서브유닛의 비율은 25°C에서 6-개월 저장 후에 모든 제형에 대해 32% 넘게 증가하였다.
- [0284] *RP-HPLC에 의한 산화된 형태%*

[0285] SAC/500/BACL 및 ARG/500/Phe는 산화된 형태의 더 적은 증가를 나타낸다.

[0286] pH 및 외형

[0287] 제조 동안과 저장시에 외형 (색, 투명성, 가시적 입자) 및 pH에 있어서 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.

[0288] 정균제 함량

[0289] 페놀 및 벤질 알코올의 목표량을 검출하였고 6-개월 내지 12-개월 안정성 체크포인트에서 어떠한 손실도 측정되지 않았다. 목표 보다 낮은 벤즈알코늄 클로라이드의 양 (10 µg/ml 대신 6 µg/ml)이 6-개월 안정성 체크포인트에서 SAC/500/BACL 제형에서 측정되었다.

[0290] 정균제의 효능

[0291] T=0에서 수행되고 제형에 대해 9개월 후에 반복된 정균제 효능 시험의 결과를 표 30 내지 33에 보고한다.

[0292] 표 30. 다중용량 제형 SAC/500/BACL에 대한 정균제 효능 시험의 결과

미생물	Log 감소 vs T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 일	T=14 일	T=28 일
스테필로코코스 아우레우스	>3	>3	>3	>3	감소하지 않음
슈도모나스 에어루기노사	>3	>3	>3	>3	감소하지 않음
에스케리키아 콜라이	시험되지 않음	n.t.	>3	>3	감소하지 않음
칸디다 알비칸스	n.t.	n.t.	>3	>3	증가하지 않음
아스퍼질러스 나이거	n.t.	n.t.	1.8	>3	증가하지 않음

[0293]

[0294] 표 31. 다중용량 제형 LYS/500/BACL에 대한 정균제 효능 시험의 결과

미생물	Log 감소 vs T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 일	T=14 일	T=28 일
스테필로코코스 아우레우스	>3	>3	>3	>3	감소하지 않음
슈도모나스 에어루기노사	>3	>3	>3	>3	감소하지 않음
에스케리키아 콜라이	시험되지 않음	n.t.	>3	>3	감소하지 않음
칸디다 알비칸스	n.t.	n.t.	>3	>3	증가하지 않음
아스퍼질러스 나이거	n.t.	n.t.	3.3	>3	증가하지 않음

[0295]

[0296] 표 32. 다중용량 제형 LYS/500/BA에 대한 정균제 효능 시험의 결과

미생물	Log 감소 vs T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 일	T=14 일	T=28 일
스테필로코코스 아우레우스	1.05	>3	>3	>3	감소하지 않음
슈도모나스 에어루기노사	>3	>3	>3	>3	감소하지 않음
에스케리키아 콜라이	시험되지 않음	n.t.	>3	>3	감소하지 않음
칸디다 알비칸스	n.t.	n.t.	>3	>3	증가하지 않음

[0297]

아스퍼질러스 나이거	n.t.	n.t.	>3	>3	증가하지 않음
------------	------	------	----	----	---------

[0298]

[0299] 표 32. 다중용량 제형 ARG/500/Phe에 대한 정균제 효능 시험의 결과

미생물	Log 감소 vs T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 일	T=14 일	T=28 일
스테필로코코스 아우레우스	0.73	>3	>3	>3	감소하지 않음
슈도모나스 에어루기노사	>3	>3	>3	>3	감소하지 않음
에스케리키아 콜라이	시험되지 않음	n.t.	>3	>3	감소하지 않음
칸디다 알비칸스	n.t.	n.t.	>3	>3	증가하지 않음
아스퍼질러스 나이거	n.t.	n.t.	>3	>3	증가하지 않음

[0300]

[0301] 0.3% 벤질 알코올 + 0.001% 벤즈알코늄 클로라이드의 조합물, 및 사카로오스 또는 리신을 함유하는 제형 (SAC/500/BACL 및 LYS/500/BACL)은 벤즈알코늄 클로라이드의 양이 목표 미만인 경우조차도 (10 µg/ml 대신 6 µg/ml) 유럽 약전의 기준 A를 충족시켰다.

[0302] 0.5% 페놀을 함유하는 제형 (ARG/500/Phe) 및 1.2% 벤질 알코올을 함유하는 제형 (LYS/500/BA)은 유럽 약전의

기준 B를 충족시켰다.

[0303]

결론

[0304]

모든 다중용량 제형은 2-8℃에서 12개월 저장 후에 양호한 안정성 프로필을 나타내었다.

[0305]

참조문헌

Burgues *et al.*; Subcutaneous self-administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotropic hypogonadism. Spanish Collaborative Group on Male Hypogonadotropic Hypogonadism; *Hum. Reprod.*; **1997**, 12(5): 980-6

Cerpa-Poljak *et al.*; Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity; *Endocrinology*; **1993**, 132(1): 351-356

Dias *et al.*; Receptor binding and functional properties of chimeric human follitropin prepared by an exchange between a small hydrophilic intercysteine loop of human follitropin and human lutropin; *J. Biol. Chem.*; **1994**, 269(41): 25289-25294

Fiddes & Talmadge; Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones; *Recent Prog. Horm. Res.*; **1984**, 40: 43-78

Flack *et al.*; Site-directed mutagenesis defines the individual roles of the glycosylation sites on follicle-stimulating hormone; *J. Biol. Chem.*; **1994**, 269(19): 14015-14020

Hakola *et al.*; Recombinant rat follicle-stimulating hormone; production by Chinese hamster ovary cells, purification and functional characterization; *Molecular and Cellular Endocrinology*, **1997**, 127(1): 59-69

Keene *et al.*; Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells; *J. Biol. Chem.*; **1989**, 264(9): 4769-4775

Keutmann *et al.*; Structure of human luteinizing hormone beta subunit: evidence for related carboxyl-terminal sequence among certain peptide hormones; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **1979**, 90(3): 842-848

Klein *et al.*; Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotrophin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey; *Fertility & Sterility*; **2002**, 77(6): 1248-1255

Klein *et al.*; Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist; *Human Reprod.*; **2003**, 18(1): 50-56

LaPolt *et al.*; Enhanced stimulation of follicle maturation and ovulatory potential by long acting follicle-stimulating hormone agonists with extended carboxyl-terminal peptides; *Endocrinology*; **1992**, 131(6): 2514-2520

Reichert & Ramsey; Dissociation of human follicle-stimulating hormone. Comparison with luteinizing hormone; *J. Biol. Chem.*; **1975**, 250(8): 3034-3040

Shome *et al.*; Human follicle stimulating hormone: first proposal for the amino acid sequence of the hormone-specific, beta subunit (hFSHb); *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1974**; 39(1):203-205

Shome, *et al.*; A reevaluation of the amino acid sequence of human follitropin beta-subunit; *J. Prot. Chem.*; **1988**, 7(4): 325-339

Steelman *et al.*; Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin; *Endocrinology*; **1953**, 53(6): 604-616

Talmadge *et al.*; Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone; *Nature*; **1984**, 307: 37-40;

[0306]

Valove *et al.*; Receptor binding and signal transduction are dissociable functions requiring different sites on follicle-stimulating hormone; *Endocrinology*; **1994**, *135*(6): 2657-2661

Van Hell *et al.*; Effects of human menopausal gonadotrophin preparations in different bioassay methods; *Acta Endocrinologica*; **1964**, *47*: 409-418

EP 0 211 894

EP 0 448 146

EP 0 487 512

EP 0 505 500

EP 0 618 808

EP 0 814 841

EP 0 853 945

WO 85/01958

WO 98/58957

WO 00/04913

WO 01/58493

WO 2004/087213

WO 2004/105788

WO 2004/112826

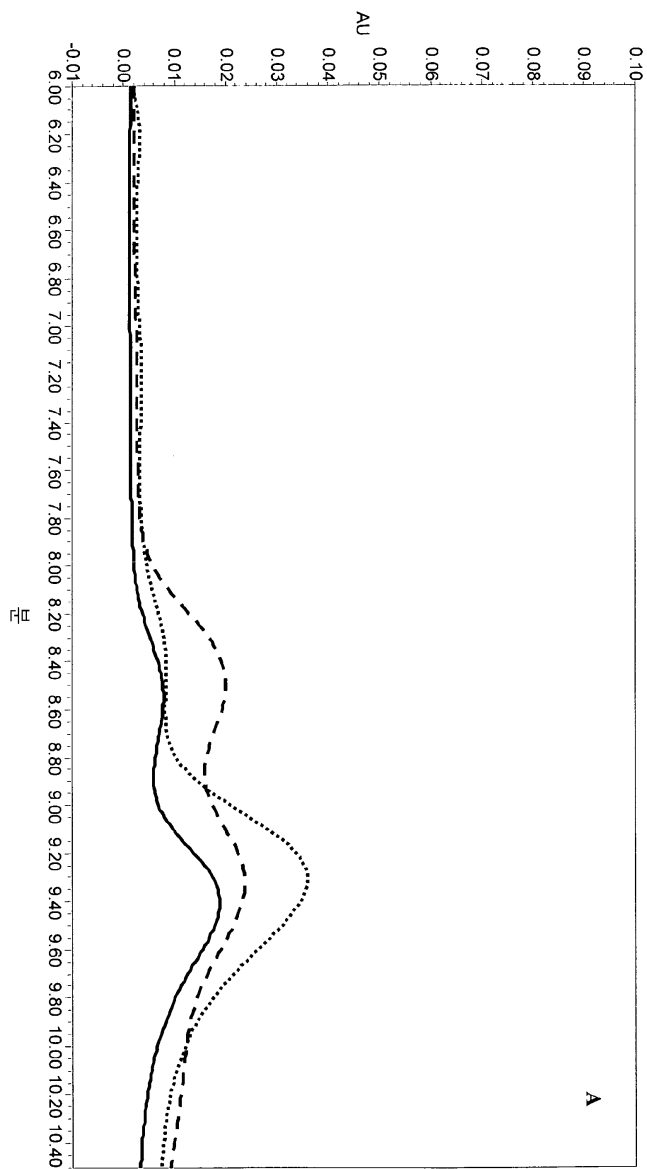
US 3,119,740

US 5,767,067

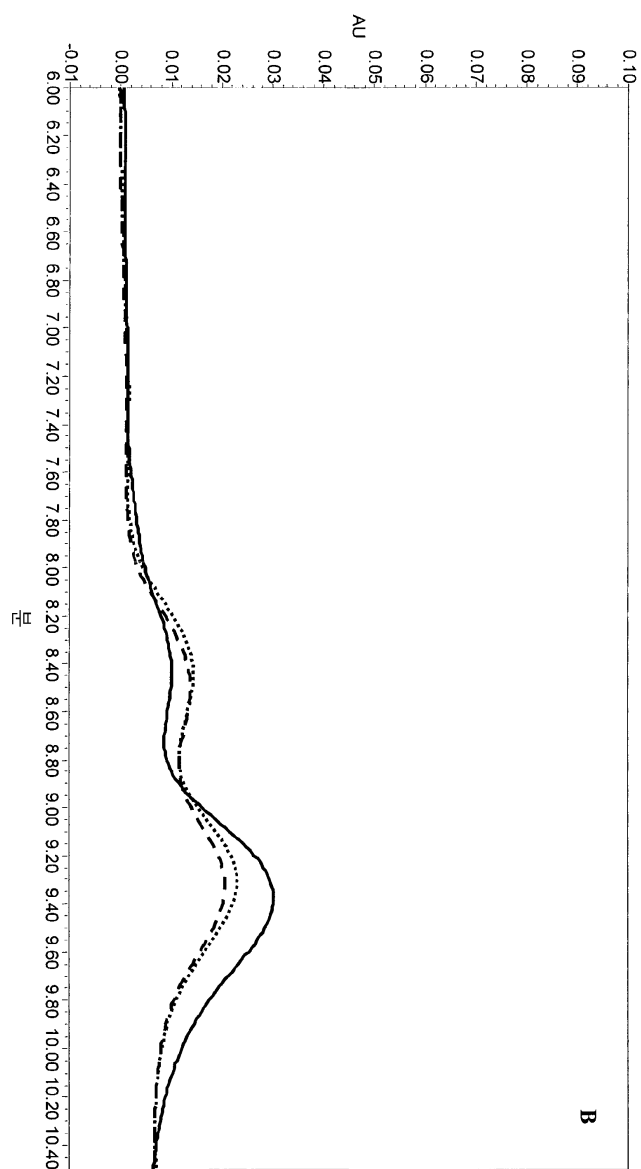
[0307]

도면

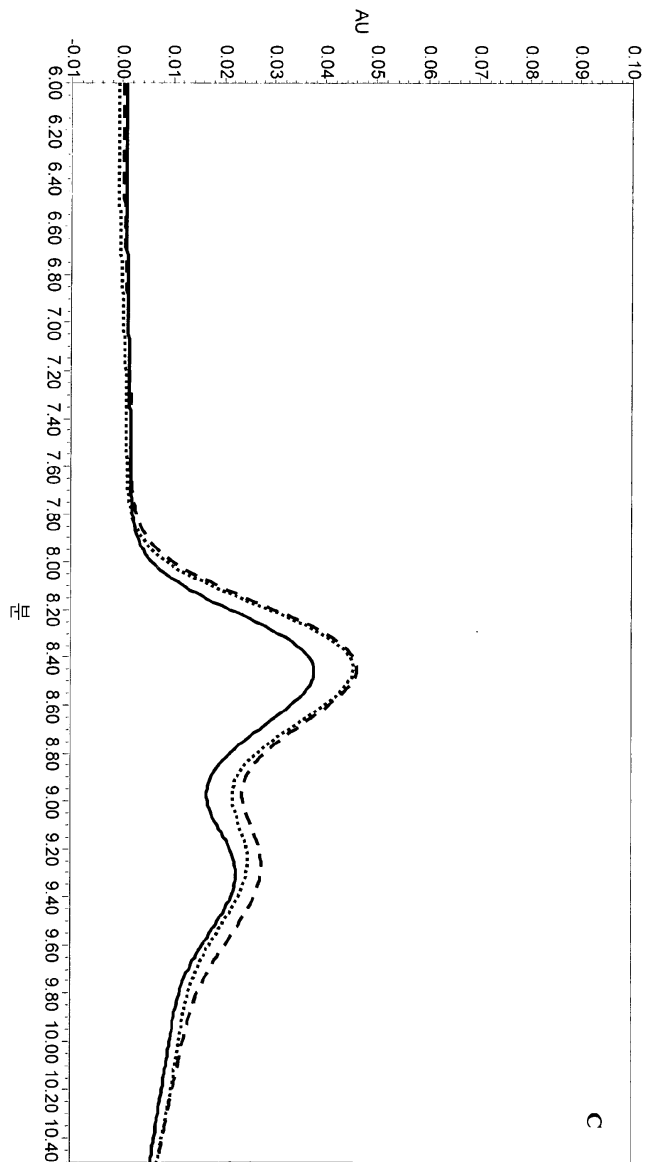
도면1a



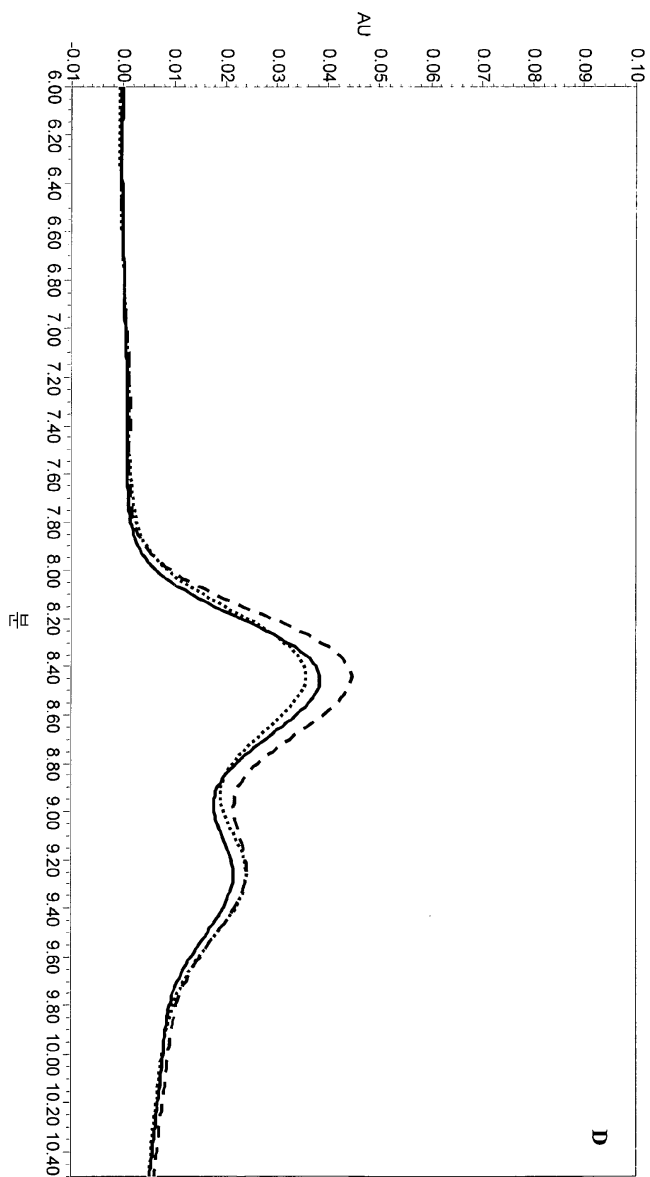
도면1b



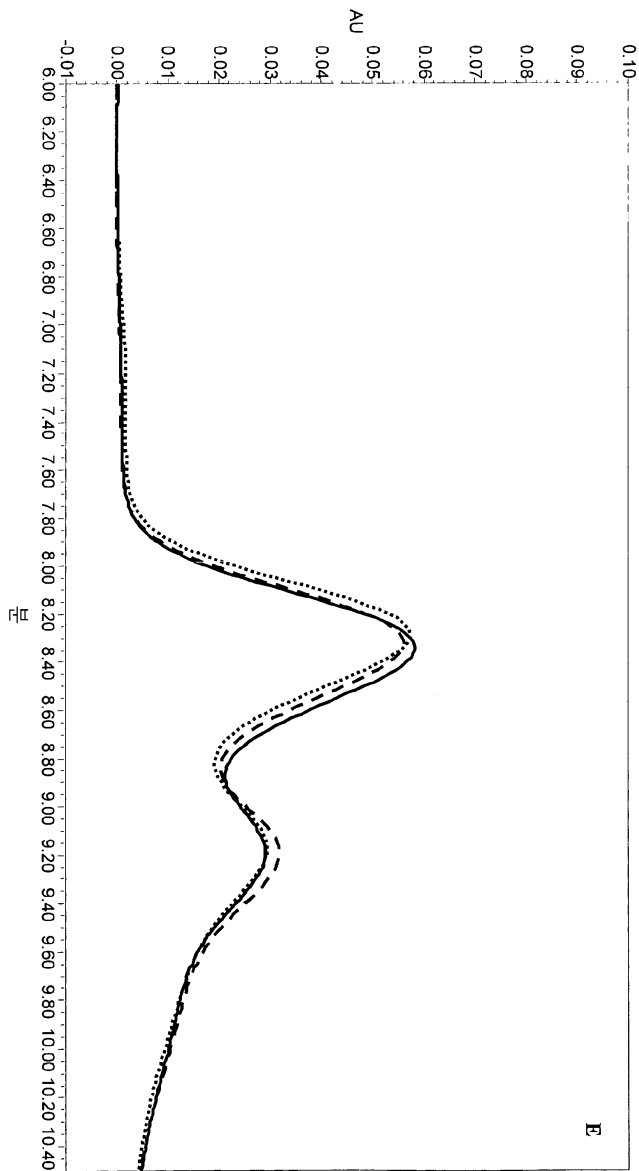
도면1c



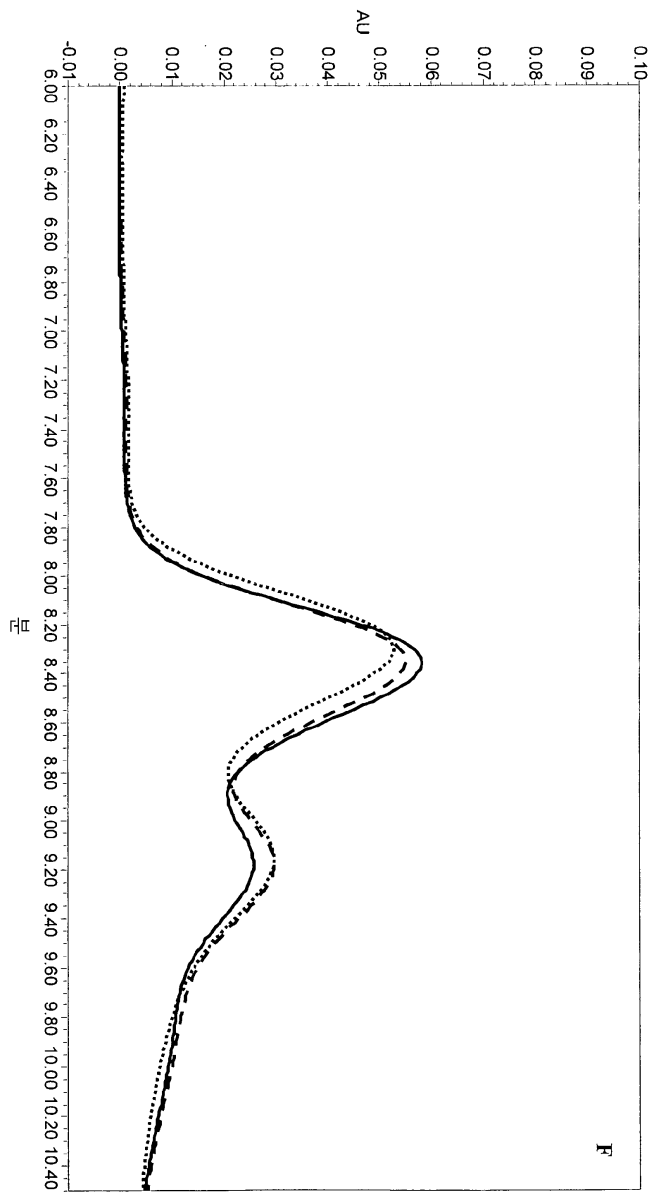
도면1d



도면1e



도면1f



도면2

