



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 13 322 T2** 2004.02.19

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 853 945 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 13 322.6**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 200 068.9**

(96) Europäischer Anmeldetag: **13.01.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.07.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.02.2004**

(51) Int Cl.7: **A61K 38/24**

A61K 47/12, A61K 47/18

(30) Unionspriorität:

97200099 **15.01.1997** **EP**

(73) Patentinhaber:

Akzo Nobel N.V., Arnheim/Arnhem, NL

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Skrabanja, A.T.P., 6703 AL Wageningen, NL; Van
den Oetelaar, P.J.M., 5384 ET Heesch, NL**

(54) Bezeichnung: **Flüssige gonadotropinhaltige Arzneimittel**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft eine flüssige, Gonadotropinenthaltende Formulierung, ein Verfahren zur Herstellung der besagten Formulierung, eine Packung enthaltend die besagte Formulierung und ein Gerät zur Verabreichung umfassend die besagte Formulierung.

[0002] Die Gonadotropine stellen eine Familie von strukturell, verwandten Glykoprotein-hormonen dar. Typische Vertreter umfassen das Choriongonadotropin (CG), das follikelstimulierende Hormon (FSH; Follitropin), das luteinisierende Hormon (LH; Lutropin) und das thyroïdstimulierende Hormon (TSH; Thyrotropin). FSH, LH und TSH sind in den meisten Vertebratenarten vorhanden und werden durch die Hypophyse hergestellt und ausgeschieden. CG wurde bis anhin nur in Primaten, einschliesslich der Menschen, und in Pferden gefunden und wird durch das Plazentagewebe hergestellt. FSH und LH sind die für die Follikelreifung und Luteinisation bei der Frau sowie für die Reifung der Hoden und Spermatogenese beim Mann essentiellen Hypophysenhormone. Gereinigtes FSH, das allein oder in Kombination mit halbgereinigten, humanen Menopausen-Gonadotropinen, die ein Gemisch von FSH und LH enthalten, wurde unter anderem zur Stimulation der Entwicklung der reifen Eifollikel verwendet, was bei assistierten Reproduktionsmethoden, wie zum Beispiel der IVF (in vitro Fertilisation) Methode, notwendig ist. Humanes, von Urin teilweise gereinigtes FSH wird ebenfalls klinisch zur Stimulation der Follikelreifung in anovulatorischen Frauen mit chronischem anovulatorischem Syndrom oder Lutealphasen Mangel verwendet. Bei Männern wurde eine Kombination von FSH und LH bei einer Anzahl von Konditionen, die mit männlicher Unfruchtbarkeit zu tun haben, verwendet.

[0003] In den letzten Jahren wurden reine Gonadotropin-Zubereitungen durch die Verwendung von rekombinanter DNA-Technologie erhältlich (siehe zum Beispiel Boime et al., Seminars in Reproductive Endocrinology 10, 45–50, 1992: „Expression of recombinant human FSH, LH and CG in mammalian cells“). Die rekombinanten Gonadotropine sind von beständiger Qualität, d.h. sie haben reproduzierbare biochemische und biologische Eigenschaften. Genomische und cDNA Klone wurden für alle Untereinheiten hergestellt und deren Primärstruktur wurde aufgeklärt. Zudem wurden Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen mit Genen von humanen Gonadotropin Untereinheiten transfiziert und es wurde von diesen Zellen gezeigt, dass sie fähig sind intakte Dimere auszuschleiden (z. Bsp. Keene et al (1989), J. Biol. Chem., 264, 4769–4775; Van Wezenbeek et al (1990), in From clone to Clinic (Ed. Crommelin D.J.A. and Schellekens H.), 245–251). Es wurde gezeigt, dass die biochemischen und biologischen Eigenschaften von z. Bsp. rekombinanten FSH beinahe identisch zu denen von natürlichem FSH sind (Mannaerts et al (1991), Endocrinology, 129, 2623–2630). Zudem wurden Schwangerschaften nach kontrollierter, ovarialer Superovulation unter Verwendung von rekombinantem FSH. ausgelöst (Germond et al (1992); Lancet 339, 1170; Devroey et al (1992), Lancet 339, 1170–1171).

[0004] Strukturell sind die Gonadotropine aus zwei ungleichen Untereinheiten zusammengesetzte Heterodimere, genannt α und β , welche durch nicht-kovalente Bindungen assoziiert sind.

[0005] Innerhalb einer Art ist die α -Untereinheit im wesentlichen für jedes Mitglied der Gonadotropin-Familie identisch; ebenso bleibt sie von Art zu Art weitgehend konserviert. Die β -Untereinheiten sind für jedes Mitglied, d.h. CG, FSH, TSH und LH, verschieden, weisen jedoch eine beträchtliche Homologie in der Struktur auf. Zudem bleiben auch die β -Untereinheiten von Art zu Art weitgehend konserviert. Bei den Menschen besteht die α -Untereinheit aus 92 Aminosäurenreste, während sich die (β -Untereinheit in der Grösse für jedes Mitglied unterscheidet: 111 Reste für hFSH, 121 Reste für hLH, 118 Reste für hTSH und 145 Reste für hCG (Combarnous, Y. (1992), Endocrine Reviews, 13, 670–691; Lustbader, J.W. et al (1993), Endocrine Reviews, 14, 291–311). Die (β -Untereinheit von hCG ist beträchtliche grösser als die anderen (β -Untereinheiten, in dem sie ungefähr 34 zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus enthält, hierin als Carboxyterminales Protein (CTP) bezeichnet.

[0006] Relativ reine Gonadotropin-Zubereitungen sind kommerziell erhältlich. Zum Beispiel sind Zusammensetzungen, die natürlich hergeleitetes, humanes Menopausen-Gonadotropin (hMG), mit FSH und LH Aktivitäten in einem Verhältnis von ungefähr 1 : 1, und natürlich hergeleitetes, humanes Choriongonadotropin enthalten, beispielsweise als gefriergetrocknete Zubereitungen unter den Handelsbezeichnungen Humegon® beziehungsweise Pregnyl® von N.V. Organon, Oss, Niederlande, erhältlich. Eine gefriergetrocknete, rekombinante, humane FSH (recFSH) Zubereitung ist zum Beispiel unter der Handelsbezeichnung Puregon® von derselben Firma erhältlich. Das rekombinante FSH. wird leichermassen zur Induktion der Ovulation und zur kontrollierten ovariellen Hyperstimulation verwendet.

[0007] Die Stabilität von Proteinen in wässrigen Formulierungen stellt in der Industrie im allgemeinen ein Problem dar., Gleichermassen reicht die Stabilität von wässrigen Lösungen von Gonadotropinen nicht aus, um ein Aufbewahren über längere Zeit zu gewähren. Dies gilt vor allem für Zubereitungen, die sehr reine, mittels rekombinanter DNA-Methoden erhaltene Gonadotropine in relativ verdünnten Lösungen enthalten. Im allgemeinen werden diese Zubereitungen deshalb in trockener Form, wie sie nach Lyophilisierung erhalten wird, gelagert.

[0008] Eine stabilisierte Gonadotropin-enthaltende, lyophilisierte, pharmazeutische Formulierung wurde im Europäischen Patent No. 448,146 (Akzo N.V.) offenbart. Diese Zubereitungen enthalten organische Carbon-säuren, insbesondere Zitronensäure, und gegebenenfalls einen nicht-reduzierenden Zucker wie zum Beispiel

Sucrose. Eine andere feste, Gonadotropin-enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung, die Sucrose als Stabilisator umfasst, ist in der Internationalen Patentanmeldung WO 93/11788 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) offenbart.

[0009] Obwohl diese gefriergetrockneten Zubereitungen stabil genug sind, um eine ausreichende Lagerbeständigkeit zu gewähren, besitzen sie den Nachteil, dass vor der Verabreichung eine Rekonstitution notwendig ist. Der Patient muss deshalb notwendigerweise das getrocknete Glykoprotein vor Gebrauch in einer Lösung rekonstituieren, was für den Patienten einen Nachteil und eine Unannehmlichkeit darstellt. Zudem muss das Lösungsmittel zusammen mit der gefriergetrockneten Gonadotropin-Zubereitung zur Verfügung gestellt werden.

[0010] Für einen Patienten, der Gonadotropin-Injektionen zu regelmässigen Zeiten braucht, zum Beispiel eine Patientin, die eine tägliche Dosis an recFSH zur Induktion der Ovulation erhält, wäre es wichtig, dass die Gonadotropin-Formulierung einfach handzuhaben, zu dosieren" und zu injizieren ist. Die Rekonstitution einer gefriergetrockneten Gonadotropin-Zubereitung verlangt Sorgfalt und Vorsicht und sollte wenn möglich vermieden werden. Es würde den Gebrauch von Gonadotropinen erleichtern, falls diese Glykoproteine in Form einer stabilen Lösung hergestellt und dem Patienten, der das Medikament direkt ohne Rekonstitution injizieren konnte; zugestellt werden könnten.

[0011] Zudem ist das Gefriertrocknungsverfahren ein kostspieliger und zeitraubender Verfahrensschritt und es wäre von Vorteil wenn dieser Schritt in der Herstellung einer Gonadotropin-Formulierung vermieden werden könnte.

[0012] Es besteht demzufolge ein Bedarf an einer gebrauchsfertigen Injektionszubereitung mit einer ausreichenden Stabilität um eine angemessene Lagerbeständigkeit zu gewährleisten.

[0013] In WO 93/22335 (COR Therapeutics Inc.) sind lagerbeständige, flüssige Zubereitungen von im wesentlichen reinen Polypeptiden offenbart, die durch Lösen der Polypeptide in einem Citratpuffer von pH 5.0 bis 5.5 hergestellt werden.

[0014] Flüssige Formulierungen, die das Gonadotropin recombinant-hCG, das mit einem nicht-reduzierenden Zucker, vorzugsweise Mannitol, stabilisiert ist, in einer wässrigen Lösung in einem Phosphatpuffer bei pH 7 enthalten, sind in WO 96/29095 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) offenbart.

[0015] Lösungen, die Gonadotropine und eine Polycarbonsäure umfassen sind vom Europäischen Patent 448,146 (Akzo N.V.) bekannt. Diese Lösungen, die zum Beispiel Zitronensäure enthalten, werden zur Herstellung von stabilisierten, lyophilisierten Gonadotropin-Formulierungen beschrieben.

[0016] Beim Lagern solcher Lösungen schlechthin über längere Zeit (Monate bei Raumtemperatur) sind die Gonadotropine, nur ungenügend stabil.

[0017] Die Erfindung betrifft eine flüssige Gonadotropinenthaltende Formulierung, die ein Gonadotropin und stabilisierende Mengen einer Polycarbonsäure oder eines Salzes davon und eine Thioether-Verbindung umfasst. Die Gonadotropin-enthaltenden Formulierungen der Erfindung besitzen bei ausgedehnter Lagerung eine verbesserte Stabilität verglichen mit Formulierungen in denen die Thioether-Verbindung fehlt.

[0018] Der Begriff Polycarbonsäure, wie er hierin verwendet wird, bedeutet eine organische Säure mit zwei oder mehr Carbonsäureresten. Typische Polycarbonsäuren sind Zitronensäure, Isozitronensäure, Weinsäure, Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Mischungen dieser Säuren. Jegliches pharmazeutisch verträgliche Salz kann verwendet werden, insbesondere Salze der Alkali oder Alkalierdmetalle, wie zum Beispiel Natrium, Kalium und Calcium. Ein bevorzugtes Salz ist. das Natriumsalz.

[0019] Der Begriff Thioether-Verbindung bedeutet eine Verbindung welche eine Alkylthioalkyl-Funktion mit der Formel R_1-S-R_2 - umfasst, worin R_1 niederes Alkyl und R_2 niederes Alkyl bedeutet. Der Begriff niederes Alkyl bedeutet eine verzweigte oder unverzweigte Alkylgruppe mit 1-6 Kohlenstoffatomen, wie zum Beispiel Hexyl, Pentyl, Butyl, tert.-Butyl, Propyl, Isopropyl, Ethyl oder Methyl. Die bevorzugte niedere Alkylgruppe ist Methyl. Der Begriff niederes Alkyl bedeutet eine Alkylengruppe mit 1-6 Kohlenstoffatomen, wie zum Beispiel 1,6-Hexandiyl, 1,5-Pentandiyl, 1,4-Butandiyl, 1,3-Propandiyl, Propyliden, 1,2-Ethandiyl, Ethyliden oder Methyliden. Die Thioether-Verbindungen besitzen vorzugsweise eine Alkylthioalkyl-Funktion, die der Seitenkette einer α -Aminosäure, wie zum Beispiel in den Aminosäuren Methionin, Homo- oder Normethionin, entspricht, entweder in Form des D- oder des L-Enantiomers oder in Form des racemischen Gemischs. Die bevorzugte Thioether-Verbindung ist die Aminosäure Methionin (R_1 bedeutet Methyl; R_2 bedeutet 1,2-Ethandiyl).

[0020] Die flüssigen Gonadotropin-enthaltenden Formulierungen der Erfindung umfassen das Gonadotropin gemischt mit den spezifischen Stabilisatoren in Lösung. Die Formulierung wird eine ausreichende Menge einer Polycarbonsäure oder eines Salzes davon, und einer Thioether-Verbindung enthalten, um das Gonadotropin in Lösung für eine erwünschte Zeit bei einer erwünschten Temperatur zu stabilisieren.

[0021] Das Gonadotropin oder die Gonadotropin-Derivate, wie sie hierin in der Definition der erfindungsgemässen Formulierung verwendet werden, sind die oben beschriebenen Proteine, zum Beispiel das follikelstimulierende Hormon (FSH), das thyroidstimulierende Hormon (TSH), das humane Choriongonadotropin (hCG), das luteinisierende Hormon (LH) oder Derivate oder Analoge sowie Mischungen davon, mit oder ohne andere Proteinkomponenten.

[0022] Das Gonadotropin kann von natürlichen Quellen, z. Bsp. von menschlichem Urin, isoliert werden oder das Gonadotropin kann auf (bio)synthetischem Wege, z. Bsp. mittels rekombinanter DNA-Methoden, hergestellt werden. Rekombinante Gonadotropine können zum Beispiel wie von Keene et al (1989) „Expression of Biologically Active Human Follitropin in Chinese Hamster Ovary Cells“, The Journal of Biological Chemistry, 264, 4769–4775, beschrieben oder wie von Reddy et al in der Internationalen Patentanmeldung WO 86/04589 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) beschrieben, hergestellt werden.

[0023] Wie hierin verwendet umfasst ein Gonadotropin wie, zum Beispiel das follikelstimulierende Hormon (FSH) die Analoga der Verbindung sowie deren rekombinante, natürliche, deglykosylierte, nicht-glykosylierte, modifiziert glykosylierte und andere Formen. Beispielsweise sind die modifizierten Formen von Gonadotropinen, worin der Carboxyterminus des Proteins mit einem Carboxyterminalen Protein (CTP) verlängert wurde, dessen Sequenz von, der β - Untereinheit des humanen Choriongonadotropin hergeleitet wurde (die CTP Sequenz stellt die Aminosäurenreste 112–118 bis 145 der hGG β -Untereinheit oder einer Variante davon dar), wie im Europäischen Patent 0,461,200 (Washington University) beschrieben, in der Definition des Gonadotropins eingeschlossen. Beispiele solcher modifizierter Formen sind das rekombinante FSH-CTP und das rekombinante LH-CTP.

[0024] Das am meisten bevorzugte Gonadotropin ist ein mittels rekombinanter DNA-Verfahren hergestelltes FSH (recFSH), entweder allein oder als Gemisch mit LH oder hCG. Von natürlichen Quellen gereinigtes FSH wird im allgemeinen nur teilweise gereinigt. Die (Protein) Verunreinigungen scheinen es etwas zu stabilisieren. Bei recFSH sind diese Verunreinigungen jedoch nicht vorhanden und deshalb ist das FSH, das bezogen auf das Protein in vergleichsweise geringen Konzentrationen vorhanden ist, anfälliger für einen raschen Abbau.

[0025] Der Begriff „Stabilisieren ist wie er hierin verwendet wird ein relativer Begriff. Unter einer Stabilisierung einer flüssigen Gonadotropin-enthaltenden Formulierung mit einem stabilisierenden Mittel oder Verbindung versteht man die Fähigkeit mittels des Stabilisators eine Abnahme in der Aktivität des Gonadotropins zu verhindern oder zu verzögern. Zum Beispiel wird eine Zubereitung als „stabilisiert“ betrachtet, falls es durch Zugabe einer stabilisierenden Verbindung („Stabilisator“) länger dauert diese bei vorgegebener Temperatur abzubauen (z. Bsp. 2 Wochen anstatt 1 Woche) und somit Teil ihrer in vivo und/oder in vitro Aktivität zu verlieren, verglichen mit der Zubereitung ohne Stabilisator.

[0026] Die Gonadotropin Aktivität kann mittels bekannter Methoden bezüglich des spezifischen Gonadotropins bestimmt werden. Eine mögliche Aktivitätsmessung kann durch das Bestimmen der Menge an (inaktiven) Oligomeren, oder modifizierten (z. Bsp. oxidierten) Monomeren der α - und β Untereinheiten, die sich mit der Zeit bilden, erzielt werden: Die Bildung von Oligomeren in einer Probe kann mittels HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) bestimmt werden. Andere Methoden zur Bestimmung der restlichen

[0027] Aktivität von zum Beispiel recFSH umfassen den wie im U.S. Patent Reissue No. 32,696 von Schuurs et al beschriebenen Enzym Immunoassay (EIA); ein unter der Handelsbezeichnung FSHEIA erhältliches Kit von BioMerieux von Marcy l'Etoile 69260 Charbonnieres-les-Bains, Frankreich für FSH; sowie einen in vitro Bioassay für sowohl FSH, FSH-CTP sowie LH, wie in Mannaerts et al, Application of in vitro Bioassays for Gonadotropins, Neuroendocrinology of Reproduction, Seiten 49– 58 (Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, NL 1987) beschrieben.

[0028] In einer bevorzugten Variante der Erfindung umfasst die flüssige, Gonadotropin-enthaltende Formulierung eine ausreichende Menge eines Zitronensäuresalzes, vorzugsweise Natriumcitrat, sowie eine ausreichende Menge der Thioether-Verbindung Methionin (racemisches DL-Gemisch) als Stabilisatoren.

[0029] Im Falle von Natriumcitrat und Methionin als ausgewählte Stabilisatoren in einer erfindungsgemässen, flüssigen Formulierung, beträgt eine geeignete Konzentration an Natriumcitrat 25–100 mM und eine geeignete Konzentration an Methionin 1–10 mM.

[0030] Es wurde festgestellt, dass der Einbau eines nichtreduzierenden Zuckers, wie zum Beispiel ein Disaccharid, wie zum Beispiel Sucrose oder Trehalose, in eine Formulierung, die bereits eine Polycarbonsäure oder ein Salz davon sowie eine Thioether-Verbindung als Stabilisatoren umfasst, die Stabilität des Gonadotropins in der flüssigen Formulierung zusätzlich steigert. In den erfindungsgemässen, Formulierungen, ist Sucrose das bevorzugte Disaccharid. Eine Konzentration an Sucrose von ungefähr 25–300 mM ist eine geeignete Menge. Besonders bevorzugt sind flüssige, Gonadotropin-enthaltende Formulierungen, die rekombinantes FSH oder ein Derivat davon, Natriumcitrat und Methionin als Stabilisatoren und eine zusätzliche Menge an Sucrose umfassen. Wenn recFSH oder recFSH-CTP das in einer flüssigen Formulierung zu stabilisierende Gonadotropin darstellt, beträgt die bevorzugte Menge an Sucrose 50 mg/ml.

[0031] Die Formulierung der Erfindung umfasst vorzugsweise ebenso ein oder mehrere nichtionische Tenside. Diese Tenside agieren als anti-Adsorptions Wirkstoffe und verhindern den Verlust des Gonadotropins in Folge von Adsorption des Proteins an den Wänden des Gefäßes, in welchem die Formulierungen aufbewahrt werden. Die Zugabe eines anti-Adsorptions Wirkstoffes zu den erfindungsgemässen Formulierungen ist vor allem notwendig wenn die Formulierungen ein rekombinantes Gonadotropin in geringen Konzentrationen umfassen.

[0032] Bevorzugte nichtionische Tenside sind Polysorbat 20, NF (Tween 20 erhältlich von Atlas Chemical

Company), Polysorbat 80, NF (Tween 80 erhältlich von Atlas Chemical Company), Brij 35 (erhältlich von ICI Pharmaceuticals) und Pluronic F123 (erhältlich von BASF). Polysorbat 20, NF (Tween 20) ist besonders bevorzugt.

[0033] Unter Polysorbat versteht man bevorzugt ein Polysorbat, welches die Spezifikation des USP/NF XXII erfüllt, die als „The National Formulary publiziert ist, S. 1763 und S. 1967, offiziell vom 1. Jan. 1990 (22nd ed., US Pharmacopeial Convention, Inc. 1989).

[0034] Ein anti-Adsorptions Wirkstoff oder anti-Adsorptions Wirkstoffe sind in solchen Mengen vorhanden, dass die Adsorption des Proteins an die Gefäßwände, oder Wände des Behälters oder Glaswaren, die bei der Verarbeitung verwendet werden, vermindert ist. Beispielsweise werden Polysorbat 20, Mengen, die ausreichen, um in der endgültigen Formulierung eine Konzentration, zwischen ungefähr 0.1 und 0.2 mg/ml zu erzielen, bevorzugt.

[0035] Die flüssige Formulierung der vorliegenden Erfindung hat einen pH zwischen 6 und 8 und vorzugsweise zwischen 6.5 und 7.2. Am meisten bevorzugt ist eine Lösung mit einem pH von ungefähr 7.0. Bei diesen pH Bereichen wurden die flüssigen Formulierungen der Erfindung am stabilsten befunden.

[0036] Die stabile Formulierung der vorliegenden Erfindung kann durch Mischen des ausgewählten Gonadotropins in wässriger Lösung mit ausreichenden Mengen einer Polycarbonsäure oder eines Salzes als Stabilisator und einer Thioether-Verbindung als Stabilisator zur Stabilisierung des Proteins, hergestellt werden, wonach gegebenenfalls eine Menge eines nichtreduzierenden Disaccharides und/oder eines nicht-ionischen Tensides in der Mischung gelöst werden. Der pH der erhaltenen Lösung wird dann auf einen Wert zwischen 6.5 und 7.2 eingestellt und die Lösung wird (steril) filtriert.

[0037] Wie hierin verwendet bedeutet eine wässrige Lösung eine Lösung, die Wasser, vorzugsweise Wasser von geeigneter Qualität für eine parenterale Verabreichung (Wasser zur Injektion USP), als das primäre, aber nicht notwendigerweise als das einzige Lösungsmittel enthält. Geringe Mengen von pharmazeutisch zulässigen, Wasser-mischbaren Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Ethanol können als Co-Lösungsmittel vorhanden sein.

[0038] In einer bevorzugten Variante der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung einer flüssigen Gonadotropin-Formulierung bereitgestellt umfassend ein Mischen von mindestens einem Gonadotropin mit einer Menge an Natriumcitrat zu einer Konzentration von 25–100 mM, und einer Menge an Methionin zu einer Konzentration von 1.10 mM in einer wässrigen Lösung; gegebenenfalls ein Auflösen einer Menge an Saccharose in besagter Mischung zu einer Konzentration von 25–300 mM sowie gegebenenfalls ein Auflösen eines nicht-ionischen Tensides, vorzugsweise Polysorbat 20, in besagter Mischung; und ein Einstellen des pHs der erhaltenen Lösung auf einen Wert zwischen 6.5 und 7.2, wonach die Lösung steril filtriert werden kann.

[0039] Allgemeine Verfahren zur Herstellung parenteraler Formulierungen, die besonders diejenigen Vorkehrungen betreffen, die getroffen werden müssen, damit die Formulierungen steril sind, sind in Fachkreisen wohl bekannt, wie zum Beispiel in Gennaro et al., Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Edition, Mack Publishing Company, 1990, siehe Teil 8 "Pharmaceutical Preparations and their Manufacture", und insbesondere das Kapitel über „Parenteral Preparations“ auf Seiten 1545–1569) beschrieben.

[0040] Vorzugsweise ist jegliches, eingesetzte Gonadotropin in der Formulierung in einer ausreichenden Menge vorhanden, um eine therapeutisch nützliche Konzentration des Proteins für eine parenterale (z. Bsp. subkutane, intramuskuläre oder intravenöse) Verabreichung zu erzielen.

[0041] Geeignete Gonadotropin Dosen sind medizinischen Praktikern bekannt, wobei die in einer Dosis enthaltene Menge im allgemeinen vom Krankheitszustand und dem speziellen, behandelten Patienten abhängig ist.

[0042] Zum Beispiel betragen geeignete Dosen für FSH ungefähr 25, bis 1500 Internationale Einheiten (International Units IU), insbesondere 50–225. Ungefähr 75 IU wird als therapeutische Menge betrachtet.

[0043] Beispielsweise wurden Mengen so hoch wie 10'000 internationale Einheiten und so gering wie 15 internationale Einheiten an HCG verabreicht sowie Injektionen, die von 20 bis 225 internationale Einheiten betragen, verwendet.

[0044] Die Gonadotropin Konzentration in den flüssigen Formulierungen der Erfindung ist von der Löslichkeit des Gonadotropins und von der therapeutischen Menge für eine gegebene Dosis abgänglich.

[0045] Die bevorzugten, flüssigen Formulierungen der vorliegenden Erfindung sind die Formulierungen, die die rekombinanten Proteine recFSH oder das recFSH-CTP Derivat davon als das Gonadotropin umfassen. Eine geeignete Konzentration des recFSH kann zwischen 20–2000 IU/ml betragen, das grobgerechnet einer Konzentration von 2–200 µg/ml entspricht (für eine Zubereitung mit einer spezifischen FSH-Aktivität von 10'000 IU/mg Protein). Ein bevorzugter Bereich reicht von 500–1500 IU/ml.

[0046] In einer bevorzugten Variante der Erfindung wird eine Kombination von FSH und LH oder FSH und HCG zusammen gelöst, um eine Formulierung mit therapeutischen Mengen beider ausgewählter Gonadotropine zu bilden.

[0047] Die flüssigen Gonadotropin-enthaltenden Formulierungen der Erfindung können im flüssigen Zustand bei verschiedenen Temperaturen über längere Zeit unter Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität und der

physikalischen Stabilität des Gonadotropins aufbewahrt werden. Vorzugsweise liegt die Aufbewahrungstemperatur unter 30°C und über der Gefriertemperatur. Die bevorzugte Aufbewahrungstemperatur liegt zwischen ungefähr 2°C und 8°C.

[0048] Die flüssigen Gonadotropin-enthaltenden Formulierungen der Erfindung können falls erwünscht gefriergetrocknet werden. In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine Packung, die eine sterile flüssige Formulierung gemäss der Erfindung enthält, bereitgestellt. Wie hierin verwendet bedeutet eine Packung einen geschlossenen Behälter, wie zum Beispiel eine Ampulle, ein Fläschchen, eine Flasche oder einen Beutel.

[0049] Eine Packung kann eine Menge einer flüssigen Gonadotropin-Formulierung, die einer oder mehrerer therapeutischen Dosen des Gonadotropins entspricht, enthalten. In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Gerät zur Verabreichung bereitgestellt, welches eine Packung, die eine sterile, flüssige Formulierung gemäss der Erfindung enthält,

[0050] umfasst. Ein bevorzugtes Gerät zur Verabreichung ist eine Art Pen-Injektor, welcher, Mittel zur einfachen Einstellung der zu injizierenden Menge einer Formulierung enthält. Solche Pen-Injektoren sind schlechthin bekannt, wie zum Beispiel der wohlbekannte B-D Pen (eine Handelsbezeichnung von Becton Dickinson and Company), ein Insulin-Injektionssystem.

[0051] Wie oben. angedeutet, löst die durch die vorliegende Erfindung bereitgestellte, flüssige Gonadotropin-Formulierung ein Problem, in dem, ganz im Gegensatz zum Stand der Technik, eine Zubereitung bereitgestellt wird, die direkt injiziert werden kann, d.h. ohne dass es für den Patienten notwendig ist, das getrocknete Produkt vor Gebrauch zu rekonstituieren. Diesbezüglich betrifft die Erfindung ebenfalls den Gebrauch eines Gonadotropins zur Herstellung eines direkt injizierbaren, flüssigen Medikamentes zur Behandlung von Unfruchtbarkeit.

[0052] Da solche Zubereitungen weder existieren noch ausgehend von den gegenwärtigen, komplizierten Injektionszubereitungen naheliegend sind, war die besagte Verwendung in Anbetracht des Stands der Technik unerwartet und besitzt deutliche Vorteile in der Behandlung von Patienten.

[0053] Das direkt injizierbare, flüssige Medikament kann in einer Packung, wie zum Beispiel einem Fläschchen oder einer Ampulle, d.h. in einer Art Behälter, aus dem es direkt aufgenommen und in ein Injektionsgerät aufgezogen werden kann, enthalten sein. Es kann ebenso in einer Art Packung enthalten, sein, welche als solches in ein Injektionsgerät, das zur Annahme einer solchen Packung adaptiert wurde, eingefügt werden, kann. Ein Beispiel dessen ist der Pen-Injektor der hierin zuvor erwähnten Art. Es sollte bemerkt werden, dass es ein zusätzlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass das flüssige Medikament in Form einer Packung für mehrfachen Gebrauch sein kann. Unter Verwendung eines Injektors mit geeigneter Skalenbezeichnung, kann der Patient jedes Mal die benötigte Menge einfach injizieren. Der hierin zuvor genannte B-D Pen-Injektor, der normalerweise für Insulin verwendet wird, besitzt ein geeignetes System zur Einstellung, der zu injizierenden Menge und kann relativ einfach mit einer Skalenbezeichnung, die dem flüssigen, Gonadotropin-enthaltenden Medikament angepasst ist, bereitgestellt werden.

[0054] In Anbetracht des obenerwähnten betrifft, die Erfindung ebenfalls die Verwendung einer Gonadotropin-enthaltenden Formulierung gemäss der Erfindung zur Behandlung von Unfruchtbarkeit, worin die Verabreichung des Medikamentes durch Injizieren von flüssigem Gonadotropin direkt vom Injektionsgerät, wie zum Beispiel eines Pen-Injektors, der mit einer die stabile, flüssige Gonadotropin-Formulierung, enthaltenden Packung beladen ist, vorgenommen werden kann.

[0055] Die Erfindung wird ferner mit Bezug auf die folgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Formulierungen, die rekombinantes FSH enthalten.

[0056] Flüssige Formulierungen, die rekombinantes FSH mit den in Tabelle I dargestellten und A–J bezeichneten Zusammensetzungen enthalten, wurden hergestellt. 0.5 ml Aliquote von jeder Zusammensetzung wurden in einem geschlossenen 2 ml Fläschchen bis zu 2 Monaten bei 8°C, 30°C beziehungsweise 40°C aufbewahrt.

[0057] Die in vitro Bioaktivität der aufbewahrten recFSH-Proben wurde dann durch Bestimmen des Ausmasses an Stimulation einer Zelle, worin ein humaner FSH Rezeptor exprimiert wird, gemessen. Die Aktivität wurde als Menge an zyklischem AMP, das nach Bindung des FSH an den FSH-Rezeptor freigesetzt wird, gemessen. In Tabelle II wird die Bioaktivität der für die angegebene Zeit und bei der angegebenen Temperatur aufbewahrten FSH-Proben als Prozent Aktivität einer ähnlichen Probe bei Zeit gleich null ausgedrückt. Die Daten in Tabelle II zeigen, dass die recFSH Formulierung ohne die Thioether-Verbindung Methionin weniger stabil, als die recFSH Formulierungen mit Methionin ist, insbesondere nach Aufbewahren bei Temperaturen, oberhalb Raumtemperatur und über längere Zeit.

Beispiel 2:

Formulierungen, die rekombinantes FSH-CTP enthalten.

[0058] Flüssige Formulierungen, die rekombinantes FSH-CTP mit den in Tabelle III dargestellten und A–J bezeichneten Zusammensetzungen enthalten, wurden hergestellt. 0.5 ml Aliquote von jeder Zusammensetzung wurden in einem geschlossenen 2 ml Fläschchen bis zu 2 Monaten bei 8 °C, 20 °C, 30 °C beziehungsweise 40 °C aufbewahrt.

[0059] Die in vitro Bioaktivität, die wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt wurde, ist in Tabelle IV dargestellt.

[0060] Die Daten in Tabelle IV zeigen, dass die recFSH-CTP Formulierung ohne die Thioether-Verbindung Methionin weniger stabil als die recFSH-CTP Formulierung mit Methionin ist, insbesondere nach Aufbewahren bei Temperaturen bei oder oberhalb Raumtemperatur.

TABELLE I: rec-FSH FORMULIERUNGEN DER ZUSAMMENSETZUNGEN A–J

Verbindungs#	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
recFSH	50 IU	50 IU	50 IU	50 IU	50 IU	600 IU	600 IU	600 IU	600 IU	600 IU
Sucrose	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Natriumcitrat dihydrat	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7
Polysorbat-20	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DL-Methionin	-	0.1	0.25	0.5	1.0	-	0.1	0.25	0.5	1.0
pH	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Wasser bis (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

in mg falls nicht anders angegeben

B–E; G–J = diese Erfindung; A und F = Referenz

TABELLE II BEIBEHALTUNG DER IN VITRO BIOAKTIVITÄT der recFSH ZUSAMMENSETZUNGEN A-J ÜBER ZEIT

	1 Monat 8 °C	1 Monat 30 °C	1 Monat 40 °C	1 Monat 8°C	1 Monat 30 °C	1 Monat 40m °C
A	90	83	63	95	84	52
B	86	82	68	95	87	60
C	76	72	67	83	89	69
D	92	98	85	95	92	73
E	97	83	73	100	83	72
F	87	84	71	90	80	55
G	97	98	84	87	85	67
H	89	90	78	96	99	83
I	99	85	75	96	88	73
J	92	90	82	100	89	75

*: Bioaktivität wird als Prozent der Aktivität bei Zeit gleich null angegeben.

TABELLE III: recFSH-CTP FORMULIERUNGEN DER ZUSAMMENSETZUNGEN A-J

Verbindungs#	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
recFSH	5 mg	5 mg	5 mg	5 mg	5 mg	30 mg	30 mg	30 mg	30 mg	30 mg
Sucrose	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Natriumcitrat dihydrat	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7
Polysorbat-20	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DL-Methionin	-	0.1	0.25	0.5	1.0	-	0.1	0.25	0.5	1.0
pH	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Wasser bis (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

in mg falls nicht anders angegeben.

B-E; G-J = diese Erfindung; A und F = Referenz

TABELLE IV: BEIBEHALTUNG DER IN VITRO BIOAKTIVITÄT der recFSH-CTP ZUSAMMENSETZUNGEN A–J ÜBER ZEIT *

	2 Monate 8 °C	2 Monate 20 °C	2 Monate 30 °C	2 Monate 40 °C
A	89	87	75	50
B	87	90	89	74
C	93	95	88	66
D	89	-	88	60
E	103	101	97	-
F	78	75	68	43
G	84	90	89	70
H	88	85	85	74
I	92	92	90	74
J	88	92	89	72

*: Bioaktivität wird als Prozent der Aktivität bei Zeit gleich null angegeben.

Patentansprüche

1. Eine flüssige Gonadotropin-enthaltende Formulierung, dadurch gekennzeichnet, dass die Formulierung ein Gonadotropin und stabilisierende Mengen einer Polycarbonsäure oder eines Salzes davon und einer Thioether-Verbindung umfasst.
2. Die flüssige Gonadotropin-enthaltende Formulierung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Thioether-Verbindung die Aminosäure Methionin darstellt.
3. Die flüssige Gonadotropin-enthaltende Formulierung gemäss Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Polycarbonsäure Zitronensäure oder das Natriumsalz davon darstellt.
4. Die flüssige, Gonadotropin-enthaltende Formulierung gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von Natriumcitrat 25–100 mM und die Konzentration von Methionin 1–10 mM beträgt.
5. Die flüssige Gonadotropin-enthaltende Formulierung, gemäss einem der Ansprüche 1–4, dadurch gekennzeichnet, dass die Formulierung zusätzlich einen nicht-reduzierenden Zucker umfasst.
6. Die flüssige Gonadotropin-enthaltende Formulierung gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der nicht-reduzierende Zucker Sukrose in einer Konzentration von 25–300 mM darstellt.
7. Die flüssige Gonadotropin-enthaltende Formulierung gemäss einem der Ansprüche 1–5, dadurch gekennzeichnet, dass die Formulierung zusätzlich ein nicht-ionisches Tensid umfasst.
8. Die flüssige Gonadotropin-enthaltende Formulierung gemäss einem der Ansprüche 1–7, dadurch gekennzeichnet, dass der pH der Formulierung zwischen 6.5 und 7.2 liegt und vorzugsweise 7 ist.

9. Die flüssige Gonadotropin-enthaltende Formulierung gemäss einem der Ansprüche 1–8, dadurch gekennzeichnet, dass das Gonadotropin ausgewählt ist aus dem luteinisierenden Hormon (LH), dem humanen Choriongonadotropin (hCG), dem follikelstimulierenden Hormon (FSH) oder Derivaten davon und Mischungen davon.

10. Die flüssige Gonadotropin-enthaltende Formulierung gemäss Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Gonadotropin das rekombinante, humane FSH (recFSH) oder das rekombinante FSH-CTP darstellt.

11. Verfahren zur Herstellung einer flüssigen Gonadotropin-Formulierung umfassend:
Mischen von mindestens einem Gonadotropin mit einer stabilisierenden Menge einer der eines Salzes polycarbonsäure davon und einer stabilisierenden Menge einer Thioether-Verbindung in einer wässrigen Lösung; gegebenenfalls Auflösen einer Menge, eines nichtreduzierenden Disaccharid des in besagter Mischung und gegebenenfalls Auflösen eines nicht ionischen Tensides in besagter Mischung; und Einstellen des pHs der erhaltenen Lösung auf einen Wert zwischen 6.5 und 7.2.

12. Verfahren zur Herstellung einer flüssigen Gonadotropin-Formulierung gemäss Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Polycarbonsäure Natriumcitrat in einer Konzentration von 25–100 mM darstellt, der Thioether Methionin in einer Konzentration von 1–10 mM darstellt; und das nichtreduzierende Disaccharid Sukrose in einer Konzentration von 25–300 mM darstellt und worin gegebenenfalls ein nichtionisches Tensid in besagter Mischung gelöst ist.

13. Eine Packung umfassend eine sterile, flüssige Gonadotropin-enthaltende Formulierung gemäss einem der Ansprüche 1–10.

14. Ein Gerät zur Verabreichung umfassend eine Packung gemäss Anspruch 13.

15. Verwendung einer Gonadotropin-enthaltenden Formulierung gemäss einem der Ansprüche 1–10 zur Herstellung eines direkt injizierbaren, flüssigen Medikamentes zur Behandlung von Unfruchtbarkeit.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen