

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 470**

51 Int. Cl.:
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 38/24 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09708298 .6**
96 Fecha de presentación: **09.02.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2249869**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2010**

54 Título: **FORMULACIÓN LÍQUIDA DE FSH.**

30 Prioridad:
08.02.2008 EP 08151231

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.01.2012

73 Titular/es:
BioGeneriX AG
Janderstrasse 3
68199 Mannheim, DE

72 Inventor/es:
STOLZENBERGER, Sascha y
KOHLER, Erich

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 372 470 T3

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

Formulación líquida de FSH

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica líquida que comprende un polipéptido de hormona estimulante del folículo, y cloruro de benzalconio y alcohol bencílico como conservantes. La composición comprende además, opcionalmente, uno o más de otros excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización, la composición contiene metionina como antioxidante. La composición muestra una buena estabilidad durante el almacenamiento y es especialmente útil para la profilaxis y el tratamiento de trastornos e indicaciones médicas en donde los preparados de hormona estimulante del folículo son considerados remedios útiles.

15 La hormona estimulante del folículo (siglas inglesas FSH) es producida por las células gonadotrópicas de la pituitaria anterior y se libera a la circulación. La FSH actúa junto con la hormona luteinizante (siglas inglesas LH) en el control de la maduración de los ovocitos en las mujeres y de la espermatogénesis en los varones. Tanto la FSH como la LH pertenecen a una familia de glicoproteínas heterodiméricas que se componen de dos cadenas α y β que no están unidas covalentemente y que están codificadas por genes distintos. Tanto la cadena α como la cadena β están glicosiladas. La subunidad α consta de 92 restos de aminoácidos, mientras que la subunidad β consta de 111 restos de aminoácido, y cada una de ellas tiene dos sitios potenciales de glicosilación unidos a asparagina.

20 La FSH humana se utiliza para el tratamiento de mujeres con anovulación, para la estimulación del desarrollo multifolicular (superovulación) y en la preparación para una concepción asistida tal como la IVF, ICSI, GIFT o CIFT. Además, la FSH humana se utiliza para estimular la maduración de los folículos en mujeres con baja o nula producción de FSH y para la estimulación de la espermatogénesis en varones con hipogonadismo hipogonadotrópico congénito o adquirido.

25 Hasta la década de 1980, una fuente primaria de la FSH humana era la FSH derivada de orina, aislada de la orina de mujeres en edad fértil. En la década de 1990 se introdujo una forma más purificada de FSH derivada de orina, de alta pureza, y finalmente se desarrolló y se ha utilizado ampliamente desde el año 1998 una FSH recombinante. Con la llegada de la tecnología del ADN recombinante, se hizo posible producir FSH humana en cultivos celulares transfectados con las secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena α y la cadena β . Las secuencias de ADN que codifican las cadenas α y β y los métodos para producir FSH recombinante han sido divulgadas, por ejemplo, en los documentos WO 88/10270, WO 86/04589 y EP 0 735 139.

35 Existen en la actualidad dos productos comerciales de FSH humana recombinante en el mercado de Alemania, GONAL-f[®] y Puregon[®], producidas ambas por expresión de las secuencias de ADN que codifican las cadenas α y β humanas de tipo natural en células ováricas de hámster chino (siglas inglesas CHO).

40 En general, las proteínas tienen una vida media muy corta, y experimentan desnaturalización, por ejemplo agregación de monómeros, disociación de dímeros, y adsorción sobre superficies de recipientes, al ser expuestas a factores diversos tales como temperaturas desfavorables para la expresión de la actividad de la proteína, el agua, la interfase con el aire, presión elevada, tensión física y mecánica, disolventes orgánicos y contaminación microbiana.

45 En consecuencia, las proteínas desnaturalizadas pierden propiedades fisicoquímicas intrínsecas y efectos fisiológicamente activos. La desnaturalización de las proteínas es irreversible y, por lo tanto las proteínas, cuando se han desnaturalizado, difícilmente pueden recuperar las propiedades nativas que poseían en su estado inicial.

50 En particular, las proteínas que tienen una estructura heterodimérica que consta de dos subunidades diferentes y se administran en una cantidad traza, inferior a algunos cientos de microgramos cada vez, tal como ocurre con la FSH humana, presentan problemas relacionados con la pérdida relativamente elevada de proteína, que incluye la pérdida de proteína a causa de la disociación de dímeros en disoluciones acuosas y a la adsorción de las proteínas en la superficie interna de recipientes. Las proteínas disociadas pierden su actividad fisiológica propia, y los monómeros disociados son fácilmente susceptibles a la agregación. Además, las proteínas absorbidas sobre la superficie interna de recipientes son también fácilmente vulnerables a la agregación a través del proceso de desnaturalización. Si se administran a un organismo humano, las proteínas así desnaturalizadas pueden desencadenar la formación de anticuerpos contra proteínas que existen de manera natural en el organismo.

55 Algunos productos farmacéuticos proteicos han superado los problemas de estabilidad a través de la liofilización (secado por congelación). Aunque estos preparados liofilizados son lo suficientemente estables para garantizar períodos de validez durante el almacenamiento suficientes, tienen el inconveniente de que es necesario reconstituirlos antes de su administración. Por lo tanto, el paciente necesariamente tiene que reconstituir la glicoproteína seca en un disolvente (por ejemplo, agua para inyección) antes del uso, lo cual constituye un inconveniente y una molestia para el paciente. Además, hay que proporcionar el disolvente junto con los preparados liofilizados de la FSH. Para un paciente que necesite inyecciones de FSH a intervalos regulares, por ejemplo un paciente que esté recibiendo una dosis diaria de FSH recombinante humana para inducir la ovulación, sería importante que la formulación de gonadotropina fuese fácil de manejar, dosificar e inyectar. La reconstitución de un

preparado liofilizado de gonadotropina requiere prudencia y cuidado, y debería evitarse siempre que sea posible. El uso de las gonadotropinas se vería facilitado si estas glicoproteínas pudiesen ser producidas y distribuidas como una disolución estable hasta llegar al paciente, quien pudiese inyectar el medicamento directamente, sin reconstitución. Además, el proceso de liofilización es una operación de proceso larga y costosa, y resultaría ventajoso el que se pudiera evitar este paso durante la preparación de una formulación de gonadotropina.

Por consiguiente, existe la necesidad de un preparado inyectable listo para usar, que tenga una estabilidad suficiente para garantizar una vida útil razonable.

Como medida alternativa para hacer frente a estas limitaciones, se puede mejorar la estabilidad de la proteína añadiendo un estabilizante a la proteína en estado disuelto. Como ejemplos de estabilizantes de proteína útiles, se conocen tensioactivos, proteínas tales como albúminas, polisacáridos, aminoácidos, polímeros, sales y similares. Sin embargo, se debe seleccionar y utilizar el estabilizante más adecuado teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas únicas de las proteínas individuales. Además, el uso combinado de estabilizantes diferentes puede conllevar efectos secundarios adversos, en lugar de los efectos esperados, a causa de acciones competitivas y reacciones adversas entre los estabilizantes individuales. Además, la estabilización satisfactoria de las proteínas presentes en la disolución requiere una cuidadosa atención y muchos esfuerzos, ya que los estabilizantes individuales presentan un intervalo específico de concentración que resulta favorable para la estabilización de las proteínas correspondientes.

Se ha formulado la FSH tanto en formatos líquidos de dosis única como formatos multi-dosis, en viales, carpulas o ampollas. Los formatos de dosis única deben permanecer estables y potentes durante el almacenamiento antes de su uso. Los formatos multi-dosis no sólo deben permanecer estables y potentes durante el almacenamiento antes de su uso, sino que también deben permanecer estables, potentes y relativamente libres de bacterias a lo largo del período de administración del régimen de dosis múltiple, después de haber desprecintado la ampolla. Por esta razón, los formatos multi-dosis contienen a menudo un agente bacteriostático.

GONAL-f[®], un preparado líquido de FSH recombinante humana listo para usar, está disponible como disolución inyectable administrada desde una pluma para inyección. La disolución contiene *m*-cresol como conservante (ROTE LISTE 2007, n° 50 004). Puregon[®] también está disponible como preparado inyectable listo para usar que contiene alcohol bencílico como conservante (ROTE LISTE 2007, n° 50 010).

También se han descrito en la bibliografía de patentes preparados líquidos de FSH que contienen un conservante. La solicitud de patente internacional WO-A1-00/04913 describe FSH y formulaciones de variantes de FSH que comprenden un conservante seleccionado de fenol, *m*-cresol, *p*-cresol, *o*-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal. Aunque el uso de estos conservantes se menciona de una manera general, no se divulga una combinación o mezcla específica de conservantes en una formulación líquida de FSH recombinante humana.

Además, la solicitud de patente internacional WO 2004/037607 se refiere a una formulación acuosa de FSH humana que comprende glicina, metionina, tensioactivo no iónico y tampón de fosfato como estabilizantes. Además, la formulación puede incluir opcionalmente un conservante, y se mencionan el alcohol bencílico, cresol, parabenos y sus mezclas.

La solicitud de patente internacional WO 2004/087213 A1 describe composiciones farmacéuticas líquidas de FSH que comprenden un tensioactivo seleccionado de Pluronic[®] F77, Pluronic[®] F87, Pluronic[®] F88 y Pluronic[®] F68. La composición puede comprender además un agente bacteriostático seleccionado de fenol, *m*-cresol, *p*-cresol, *o*-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabenos, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal. No se mencionan mezclas o combinaciones de agentes bacteriostáticos.

Así, aunque se desea proporcionar formulaciones de gonadotropina que contengan conservantes, de manera que la formulación sea adecuada para la administración múltiple, la producción de preparados farmacéuticos con conservante que contengan proteína humana ha demostrado ser difícil. Se ha observado que cuando se utilizan conservantes, estos originan problemas de estabilidad si los preparados farmacéuticos son almacenados durante períodos prolongados. Durante este tiempo, las proteínas humanas se inactivan y se forman aglomerados, lo que puede ser la causa de la intolerancia observada a las disoluciones inyectadas. Los procedimientos habituales para la producción de formulaciones farmacéuticas con conservante para fines de infusión o inyección no se pueden utilizar en el caso de ingredientes de proteína humana activa, ya que las sustancias activas son inactivadas en las condiciones de esterilización en autoclave a 121°C y su estructura queda destruida. También se sabe que los conservantes habituales utilizados en farmacia reaccionan con los ingredientes de proteína humana activa y estos quedan así inactivados. El tipo de conservante utilizado desempeña un papel importante para la tolerancia. Todos los conservantes tienen una mayor o menor tasa de alergia. Por tanto, es crucial que en una formulación con proteína humana los conservantes sean seleccionados de manera que se logre una buena conservación, pero también se reduzcan al mínimo los inconvenientes de conservantes específicos en combinación con determinadas glicoproteínas humanas.

Por tanto, existe todavía la necesidad urgente de desarrollar una nueva formulación líquida de la FSH recombinante humana conservada por la presencia de conservantes y que sea capaz de mantener de manera estable la actividad de la FSH recombinante humana durante un período prolongado de tiempo.

- 5 De acuerdo con la presente invención, este problema y otros más se resuelven por medio de las características de la reivindicación principal.

En las reivindicaciones dependientes se definen realizaciones ventajosas.

- 10 Sorprendentemente, se ha encontrado que el hecho de formular una FSH humana recombinante en una composición farmacéutica líquida que comprenda FSH o una variante de la misma como agente activo y cloruro de benzalconio y alcohol bencílico, a la vez, como conservantes proporciona una buena estabilidad de la composición, de modo que puede ser utilizada para el uso de dosis única y para el uso multi-dosis. La composición de acuerdo con la invención se puede almacenar sin refrigeración durante un período prolongado de tiempo, sin pérdida significativa de actividad y sin degradación significativa. Se supone que la combinación de cloruro de benzalconio y alcohol bencílico como conservantes resulta particularmente ventajosa en lo que se refiere a la glicohormona FSH, ya que proporciona una mejor conservación y asegura que las interacciones desfavorables con la FSH se mantengan en el mínimo.

- 20 Salvo que se indique lo contrario, las siguientes definiciones pretenden explicar y definir el significado y el alcance de los diversos términos utilizados para describir la presente invención.

25 El término "FSH" se refiere a un polipéptido de hormona estimulante del folículo en forma de una proteína madura de longitud completa que incluye, pero sin quedar limitado a ésta, la FSH humana o "hFSH", ya sea producida por técnicas recombinantes o aislada de fuentes humanas, tales como la orina de mujeres posmenopáusicas. La secuencia proteica de la glicoproteína humana y la secuencia proteica de la subunidad β de la FSH humana son conocidas para el experto a partir de la bibliografía científica y de patentes (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/087213).

- 30 La secuencia de aminoácidos de la cadena α de la FSH humana está ilustrada en la SEQ ID N° 1, y la secuencia de aminoácidos de la cadena β de la FSH humana está ilustrada en la SEQ ID N° 2, adjuntas a la presente memoria descriptiva. Estas secuencias de aminoácidos corresponden a las secuencias de aminoácidos del tipo natural de las cadenas α y β de la FSH humana, depositada con el número de acceso J 00152 en la base de datos EMBL y con el número de acceso NM_000510 en la base de datos NCBI, respectivamente.

- 35 Las secuencias de ácido nucleico de tipo natural que codifican la FSH humana se muestran en la SEQ ID N° 3 (= cadena α) y N° 4 (= cadena β).

- 40 La FSH recombinante puede estar codificada por la secuencia de ácido nucleico de tipo natural tal como se encuentra de manera natural en seres humanos, o bien puede estar codificada por una secuencia de ácido nucleico alterada, cuya expresión da como resultado una FSH que tiene la secuencia aminoacídica de tipo natural, es decir, la secuencia de tipo natural de la proteína tal como se encuentra de manera natural en seres humanos.

- 45 La secuencia de ácido nucleico que codifica la FSH humana puede ser modificada, por ejemplo, de forma tal que una o ambas de las secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena α y la cadena β de la FSH humana hayan sido adaptadas en cuanto al uso de codones en células ováricas de hámster chino (CHO) con el fin de aumentar el nivel de expresión y el rendimiento de FSH recombinante en estas células hospedantes.

- 50 En la solicitud de patente internacional WO 2009/000913 se describe un ejemplo de secuencias de ácido nucleico que codifican la FSH humana y que han sido modificadas en cuanto al uso de codones en las células CHO. La secuencia modificada de ácido nucleico que codifica la cadena β de la FSH humana es la región codificante de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID N° 5 (en la SEC ID N° 5 la región codificante comienza en el nucleótido 56 y se extiende hasta el nucleótido 442), y la secuencia modificada de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana es la región codificante de la secuencia de ácido nucleico proporcionada en SEQ ID N° 6 (en la SEC ID N° 6 la región codificante comienza en el nucleótido 19 y se extiende hasta el nucleótido 366). El 28 de marzo de 2007 se depositó en la DSMZ en Braunschweig, con el número de depósito DSM ACC2833, una línea de células CHO que contienen una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una primera secuencia modificada de ácido nucleico que codifica la cadena β de la FSH humana y una segunda secuencia modificada de ácido nucleico que codifica la cadena α de la FSH humana.

- 60 En una realización preferida, la formulación líquida de FSH de acuerdo con la presente invención contiene una FSH humana recombinante de tipo natural que se ha obtenido por expresión de genes recombinantes a partir de secuencias de ácido nucleico de FSH, que han sido modificadas en cuanto al uso de codones en células CHO con respecto tanto a la cadena β de la FSH humana como a la cadena α de la FSH. En otra realización preferida, la FSH recombinante se obtiene por expresión de las secuencias de ácido nucleico de FSH divulgadas en el documento

WO 2009/000913.

La expresión "variante de FSH" pretende abarcar aquellas moléculas que difieren de la FSH humana en la secuencia de aminoácidos, en el patrón de glicosilación, o en el enlace entre subunidades, pero exhiben actividad de FSH. Los ejemplos incluyen CTP-FSH, una FSH recombinante modificada de acción prolongada, que consiste en una subunidad α de tipo natural y una subunidad β híbrida en la cual se ha fusionado el péptido carboxi-terminal de hCG al extremo C-terminal de la subunidad β de FSH, tal como se describe en LaPolt et al. (1992) *Endocrinology*, 131, 2514-2520, o en Klein et al. (2003) *Human Reprod.*, 18, 50-56. También se incluye una CTP-FSH de cadena sencilla, una molécula de cadena única descrita por Klein et al. (2002) *Fertility & Sterility*, 77, 1248-1255. Otros ejemplos de variantes de FSH incluyen moléculas de FSH que tienen sitios de glicosilación adicionales incorporados en la subunidad α y/o la subunidad β , según se divulga en el documento WO 01/58493, y moléculas de FSH con enlaces S-S entre subunidades, según se divulga en el documento WO 98/58957. Otros ejemplos de variantes de FSH se divulgan en el documento WO 2004/087213, y se caracterizan por supresiones en el extremo carboxi-terminal de la subunidad β . Otros ejemplos de variantes de FSH incluyen moléculas de FSH que tienen un grado de glicosilación alterado en comparación con la FSH de tipo natural debido a cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína mediante los cuales se introducen uno o varios sitios de glicosilación adicionales o bien se eliminan uno o varios sitios de glicosilación presentes de manera natural.

Además, la FSH o variante de FSH de acuerdo con la invención puede ser una molécula de FSH que ha sido modificada por medio de restos químicos. Tales conjugados de FSH pueden comprender, por ejemplo, polialquilenglicol (por ejemplo PEG), hidroxialquilalmidón (por ejemplo HES) u otros restos poliméricos.

Se puede producir heterodímeros de FSH o heterodímeros de variante de FSH por cualquier método adecuado, por ejemplo mediante técnicas recombinantes, por aislamiento o purificación a partir de fuentes naturales, según sea el caso, o por síntesis química, o mediante cualquier combinación de éstos.

El uso del término "recombinante" se refiere a preparados de FSH o variantes de FSH que han sido producidas mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante (véase, por ejemplo, el documento WO 85/01958). Las secuencias de los clones genómicos y de cADN de FSH son conocidas para las subunidades α y β de varias especies. En el estado de la técnica se describen varios métodos para producir FSH o variantes de FSH recombinantes mediante tecnología recombinante; véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea EP 0 711 894 y la solicitud de patente europea EP 0 487 512.

La FSH o variante de FSH utilizada según la presente invención puede ser producida no sólo por medios recombinantes, entre ellos las células de mamíferos, tales como las células ováricas de hámster chino (CHO), sino que también puede ser purificada a partir de otras fuentes biológicas, tales como fuentes consistentes en orina. En el estado de la técnica se han divulgado metodologías aceptables.

La FSH recombinante humana puede ser purificada a partir del sobrenadante de cultivo de células hospedantes mediante una o varios pasos de purificación. Los métodos de purificación adecuados son conocidos por los expertos e incluyen la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía sobre hidroxapatito, cromatografía de afinidad y filtración en gel. Se han divulgado métodos para purificar FSH humana recombinante en, por ejemplo, los documentos WO 00/63248, WO 2006/051070 y WO 2005/063811.

En una realización preferida de la invención, la FSH o variante de FSH corresponde a la FSH humana o se origina a partir de la FSH humana, respectivamente. En una realización preferida de la invención, la FSH o variante de FSH ha sido producida mediante tecnología recombinante.

Muy preferiblemente, la FSH es FSH humana que ha sido producida de manera recombinante, de manera particularmente preferible producida en células ováricas de hámster chino transfectadas con un vector o vectores que comprenden ADN que codifica la glicoproteína humana de la subunidad α y de la subunidad β de FSH, ya sean codificadas por las SEC ID N°s 3 y 4 (=secuencias de ácido nucleico de tipo natural) o por las SEC ID N°s 5 y 6 (= secuencias de ácido nucleico optimizadas en cuanto a codones). Pueden encontrarse en el mismo vector ADN que codifique la subunidad α y ADN que codifique la subunidad β , y también en vectores diferentes.

La FSH recombinante presenta varias ventajas sobre su homólogo urinario. Las técnicas de cultivo y aislamiento con células recombinantes permiten la coherencia entre los distintos lotes. Por el contrario, la FSH urinaria varía mucho de un lote a otro en características tales como pureza, patrón de glicosilación, sialilación y oxidación de las subunidades. Debido a la mayor consistencia entre lotes y pureza de la FSH recombinante, la hormona puede ser fácilmente identificada y cuantificada mediante técnicas tales como el enfoque isoeléctrico (IEF). La facilidad con la que se puede identificar la FSH recombinante permite el llenado de los viales por masa de hormona (lo que se denomina "llenado por masa") en lugar del llenado por valoración biológica.

La expresión "actividad de FSH" se refiere a la capacidad de una formulación de FSH para provocar respuestas biológicas asociadas con la FSH, tales como aumento del peso ovárico en el ensayo de Steelman-Pohley (Steelman

et al. (1953) *Endocrinology* 53, 604-616), o el crecimiento folicular en un paciente de sexo femenino. El crecimiento folicular en un paciente de sexo femenino puede ser evaluado mediante ultrasonidos, por ejemplo en términos del número de folículos con un diámetro medio de unos 16 mm en el día 8 de estimulación. La actividad biológica se evalúa con respecto a un estándar aceptado de FSH.

5 La expresión "diluyente acuoso" se refiere a un disolvente líquido que contiene agua. Los sistemas de disolvente acuoso pueden consistir exclusivamente en agua, o bien pueden consistir en agua y uno o más disolventes miscibles, y pueden contener solutos disueltos, tales como azúcares, tampones, sales u otros excipientes. Los disolventes no acuosos más comúnmente utilizados son los alcoholes orgánicos de cadena corta, tales como metanol, etanol, propanol, cetonas de cadena corta, tales como la acetona, y polialcoholes, tales como el glicerol. En una realización preferida de la invención, el diluyente acuoso es el agua, es decir, la formulación líquida, lista para su uso, de acuerdo con la invención es una formulación acuosa.

15 Un "agente modificador de la tonicidad" o "agente isotonzante" es un compuesto que se tolera físicamente e imparte tonicidad adecuada a una formulación para evitar el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación. Los agentes isotonzantes adecuados incluyen, pero sin quedar limitados a éstos, glicerol, aminoácidos o proteínas (por ejemplo glicina o albúmina), sales (por ejemplo cloruro de sodio), azúcares (por ejemplo dextrosa, sacarosa, trehalosa y lactosa) y azúcar-alcoholes (por ejemplo, manitol y sorbitol).

20 El término "bacteriostático" o "agente bacteriostático" o "conservante" se refiere a una composición o sustancia que se añade a una formulación para actuar como agente antibacteriano. Una FSH o variante de FSH, conservada, que contiene la formulación de la presente invención cumple preferiblemente con las normas legales o reguladoras en cuanto a la eficacia del conservante para que sea un producto multi-uso comercialmente viable, de preferencia en seres humanos.

25 Los bacteriostáticos utilizados en las formulaciones de acuerdo con la invención son cloruro de benzalconio y alcohol bencílico en combinación. Aunque es posible incluir conservantes adicionales, tales como el fenol, *m*-cresol, *p*-cresol, *o*-cresol, clorocresol, alquilparabenos (metil-, etil-, propil-, butil- y similares), cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio o timerosal, en la composición, es decir, además de cloruro de benzalconio y alcohol bencílico, se prefiere que sólo están presentes como conservantes cloruro de benzalconio y alcohol bencílico.

35 El término "tampón" o "tampón fisiológicamente aceptable" se refiere a soluciones de compuestos que se sabe que son seguros para uso farmacéutico o veterinario en las formulaciones, y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación en el intervalo de pH deseado para la formulación. Los tampones aceptables para controlar el pH desde un pH moderadamente ácido hasta un pH moderadamente básico incluyen, pero sin quedar limitados a éstos, compuestos tales como el fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina. Los tampones preferidos son tampones de fosfato.

40 La expresión "tampón de fosfato" se refiere a soluciones que contienen ácido fosfórico o sus sales, ajustadas a un pH deseado. En general, los tampones de fosfato se preparan a partir de ácido fosfórico, o una sal de ácido fosfórico, que incluye, pero sin quedar limitadas a éstas, sales de sodio y de potasio. Se conocen en la técnica diversas sales de ácido fosfórico, tales como sales monobásicas, dibásicas y tribásicas, de sodio y de potasio, del ácido. También se conocen sales de ácido fosfórico que se presentan como hidratos de la sal en cuestión. Los tampones de fosfato puede abarcar un intervalo de pH, por ejemplo, desde alrededor de pH 4 hasta alrededor de pH 10, siendo un intervalo preferido desde alrededor de pH 5 hasta alrededor de pH 9, y un intervalo muy preferido desde exacta o aproximadamente 6,0 hasta exacta o aproximadamente 8,0, muy preferiblemente exacta o aproximadamente pH 7,0. En una realización preferida, el sistema de tampón consiste exclusivamente en un tampón de fosfato, es decir, no está presente en la formulación más agente de tampón que el fosfato.

50 El término "vial" se refiere a grandes rasgos a un recipiente adecuado para contener FSH en forma líquida en un estado estéril contenido. Los ejemplos de viales, tal como se utiliza el término en la presente memoria, incluyen ampollas, cartuchos, envases alveolares u otro recipiente semejante adecuado para la administración de FSH al paciente mediante jeringa, bomba (inclusive osmótica), catéter, parche transdérmico, aerosol pulmonar o transmucosal. Los viales adecuados para el envasado de productos para la administración por vía parenteral, pulmonar, transmucosal o transdérmica son bien conocidos y reconocidos en la técnica.

60 El término "estabilidad" se refiere a la estabilidad física, química, y conformacional de FSH en las formulaciones de la presente invención (inclusive el mantenimiento de la actividad biológica). La inestabilidad de una formulación de proteína puede ser causada por degradación química o por agregación de las moléculas de proteína para formar polímeros de mayor orden, por disociación de los heterodímeros en monómeros, por desglicosilación, modificación de la glicosilación, oxidación (sobre todo de la subunidad α) o por cualquier otra modificación estructural que reduzca al menos una actividad biológica de un polipéptido de FSH incluido en la presente invención.

65 Una disolución o formulación o composición farmacéutica "estable" es una en la cual el grado de degradación, modificación, agregación, pérdida de actividad biológica y similares, de las proteínas presentes en la misma está

controlado de forma aceptable, y no aumenta excesivamente con el tiempo. Preferiblemente, la formulación conserva al menos exacta o aproximadamente 80% de la actividad de FSH y al menos durante un período de 6 meses a una temperatura de exacta o aproximadamente 2-8°C. La actividad de FSH se puede medir mediante la valoración biológica de aumento de peso ovárico de Steelman-Pohley.

5 El término "tratamiento" se refiere a la administración, seguimiento, gestión y/o cuidado de un paciente para el cual es deseable la administración de FSH con el objetivo de estimulación folicular o testicular o cualquier otra respuesta fisiológica regulada por la FSH. Así, el tratamiento puede incluir, pero sin quedar limitado a esto, la administración de FSH para la inducción o la mejora de la calidad del esperma, la estimulación de la liberación de testosterona en el varón, o el desarrollo folicular o la inducción de la ovulación en la mujer.

15 Las expresiones "administración multi-dosis" o "uso en multi-dosis" pretenden incluir el uso de un único vial, ampolla, carpula o cartucho de una formulación de FSH para más de una inyección, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o más inyecciones. Las inyecciones se realizan preferiblemente a lo largo de un período de al menos exacta o aproximadamente 12 horas, 24 horas, 48 horas, etc., de preferencia hasta un período de exacta o aproximadamente 12 días. Las inyecciones pueden estar espaciadas en el tiempo, por ejemplo, por un período de 6, 12, 24, 48 ó 72 horas.

20 Los autores de la presente invención han encontrado que mediante la formulación de FSH o variantes de FSH con cloruro de benzalconio y alcohol bencílico, a la vez, como conservantes, obtienen una formulación que presenta una elevada estabilidad de la proteína y al mismo tiempo una buena conservación. Además, se supone que las composiciones de formulación de FSH de acuerdo con esta invención muestran una tolerancia local mejorada (por ejemplo, no se produce irritación en el punto de inyección) en comparación con las formulaciones de FSH conocidas en la técnica.

25 Preferiblemente, está presente cloruro de benzalconio en la formulación en una concentración que es suficiente para mantener la estabilidad de la FSH durante el período de almacenamiento deseado (por ejemplo, de 6 a 12 a 24 meses), y también a una concentración que es suficiente para prevenir el crecimiento bacteriano.

30 Preferiblemente, la concentración de cloruro de benzalconio en la formulación líquida de acuerdo con la invención se sitúa en exacta o aproximadamente 0,005 mg/ml hasta exacta o aproximadamente 0,05 mg/ml, con mayor preferencia en exacta o aproximadamente 0,01 mg/ml hasta exacta o aproximadamente 0,04 mg/ml, y muy preferiblemente en exacta o aproximadamente 0,02 mg/ml (0,002% (peso/volumen)).

35 Preferiblemente, está presente alcohol bencílico en la formulación en una concentración que es suficiente para mantener la estabilidad de la FSH durante el período de almacenamiento deseado (por ejemplo, de 6 a 12 a 24 meses) y también a una concentración que es suficiente para prevenir el crecimiento bacteriano.

40 Preferiblemente, la concentración de alcohol bencílico en las formulaciones líquidas de acuerdo con la invención se sitúa en exacta o aproximadamente 0,5 mg/ml hasta exacta o aproximadamente 20,0 mg/ml, con mayor preferencia en exacta o aproximadamente 1,0 mg/ml hasta exacta o aproximadamente 15,0 mg/ml, en particular más preferiblemente en exacta o aproximadamente 5,0 mg/ml hasta exacta o aproximadamente 12,0 mg/ml, y muy preferiblemente en exacta o aproximadamente 10,0 mg/ml (1,0% (peso/volumen)).

45 Preferiblemente, la hormona estimulante del folículo (FSH) contenida en las formulaciones líquidas de acuerdo con la invención está presente a una concentración de exacta o aproximadamente 150 UI/ml hasta exacta o aproximadamente 2.000 UI/ml, con mayor preferencia de exacta o aproximadamente 300 UI/ml hasta exacta o aproximadamente 1.500 UI/ml, de manera particularmente más preferible de exacta o aproximadamente 450 UI/ml hasta exacta o aproximadamente 750 UI/ml, muy preferiblemente exacta o aproximadamente 600 UI/ml.

50 La actividad biológica específica in vivo de la FSH recombinante se sitúa habitualmente en el intervalo de alrededor de 8.000 UI de FSH/mg de proteína hasta alrededor de 16.000 UI de FSH/mg de proteína. Por ejemplo, la FSH recombinante humana en el producto comercialmente disponible Puregon (de Organon) tiene una actividad biológica específica de alrededor de 10.000 UI/mg de proteína, y en Gonal-f de Serono la actividad biológica de la FSH recombinante humana es de de alrededor de 13.600 UI/mg de proteína.

55 La actividad de FSH puede ser determinada por métodos conocidos en relación con FSH y otras gonadotropinas. Tales métodos incluyen por ejemplo, ensayo de inmunoadtividad enzimática (EIA) o ensayos de gen informador. La actividad biológica se determina habitualmente mediante la valoración biológica descrita en la Farmacopea Europea, 5ª edición, para FSH derivada de orina. Al hacerlo así, la actividad biológica se calcula comparando el efecto de la FSH en el engrosamiento de los ovarios de ratas inmaduras tratadas con gonadotropina coriónica con el mismo efecto de un preparado estándar.

65 La concentración de FSH o variante de FSH en la composición farmacéutica líquida de acuerdo con la invención se sitúa habitualmente en el intervalo de 10 a 200 µg/ml. Si la composición está destinada a la administración multi-uso,

por ejemplo mediante el uso de una pluma para inyección, la concentración útil de FSH o variante de FSH se situará en el intervalo de 30 a 150 µg/ml, con preferencia en el intervalo de 40 a 100 mg/ml.

5 En general, la concentración de FSH dependerá del uso (dosis única o multi-dosis), de la vía de administración, de la herramienta de administración y de la actividad biológica de la FSH o variante de FSH.

Preferiblemente, la variante de FSH o FSH es el único agente farmacéuticamente activo presente en la composición farmacéutica, aunque es posible incluir otras gonadotropinas, tales como la LH.

10 La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender además un tensioactivo, preferentemente un tensioactivo no iónico, con el fin de evitar la adsorción de FSH o variante de FSH en la superficie del vial, ampolla, carpula, cartucho o jeringa. En este caso, el tensioactivo no iónico disminuye la tensión superficial de una solución proteica, evitando así la adsorción o la agregación de las proteínas sobre la superficie hidrófoba. Los ejemplos preferidos del agente tensioactivo no iónico que se puede utilizar en la presente invención pueden incluir un tensioactivo no iónico basado en polisorbato y un tensioactivo no iónico basado en poloxámero. Estos tensioactivos no iónicos se pueden utilizar solos o en cualquier combinación de los mismos. Se prefiere particularmente un tensioactivo no iónico basado en polisorbato. Los ejemplos específicos de tensioactivo no iónico basado en polisorbato incluyen polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80. Se prefieren más particularmente polisorbato 20 y polisorbato 80, y el más preferido es el polisorbato 20. El polisorbato 20 tiene una concentración micelar crítica relativamente baja. Por tanto, el polisorbato 20 no sólo reduce o previene la adsorción superficial de las proteínas, incluso a bajas concentraciones, sino que también inhibe la degradación química de las proteínas. El uso de tensioactivo no-iónico a alta concentración en la composición líquida de acuerdo con la invención no es apropiado. Esto se debe a que el uso del tensioactivo no iónico a alta concentración produce efectos de interferencia, lo que hace difícil evaluar con precisión la estabilidad de las proteínas, cuando la determinación de la concentración o la evaluación de la estabilidad de las proteínas se lleva a cabo mediante un método de análisis tal como la espectroscopia UV o el enfoque isoelectrico. Por lo tanto, la formulación acuosa de la presente invención contiene el tensioactivo no iónico en una concentración inferior a 1,0 mg/ml, y más preferiblemente de 0,05 a 0,5 mg/ml.

30 En una realización preferida, el único tensioactivo presente en la formulación es polisorbato 20.

Preferiblemente, las formulaciones de FSH de la presente invención tienen un pH entre exacta o aproximadamente 6,0 y exacta o aproximadamente 8,0, con mayor preferencia desde exacta o aproximadamente 6,5 hasta exacta o aproximadamente 7,5, lo que incluye aproximadamente pH 6,8, pH 7,0, pH 7,2 y pH 7,4. El tampón preferido es el fosfato, y los contra-iones preferidos son iones de sodio o iones de potasio.

40 Las concentraciones de tampón en la disolución total pueden variar entre 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM y 500 mM. Preferiblemente, la concentración de tampón se sitúa en exacta o aproximadamente 50 mM. Se prefiere particularmente un tampón 50 mM en iones fosfato con un pH de 7,0.

El pH de la formulación se puede ajustar mediante la adición de un ácido o una base adecuados en una cantidad apropiada. En una realización, el pH de la composición farmacéutica líquida se ajusta con NaOH.

45 Preferiblemente, las formulaciones de la invención contienen un antioxidante, tal como metionina, bisulfito de sodio, sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BAH). El más preferido es la metionina. El antioxidante previene la oxidación de la FSH (en particular de la subunidad α).

50 Preferiblemente, en la composición farmacéutica líquida está presente metionina en una concentración de exacta o aproximadamente 0,1 a exacta o aproximadamente 1,0 mg/ml, con mayor preferencia exacta o aproximadamente 0,2 a 0,8 mg/ml, muy preferiblemente exacta o aproximadamente 0,5 mg/ml.

En una realización preferida, la metionina es el único antioxidante presente en la formulación de la invención.

55 Preferiblemente, las formulaciones de la invención contienen un mono o disacárido o un azúcar-alcohol en calidad de estabilizante y agente para ajuste de la tonicidad, por ejemplo sacarosa, dextrosa, lactosa, sorbitol y/o glicerol. El más preferido es un azúcar-alcohol, de manera particularmente preferida el manitol.

60 El azúcar o azúcar-alcohol está presente de preferencia en una concentración de exacta o aproximadamente 1,0 a 10 mg/ml, muy preferiblemente a una concentración de exacta o aproximadamente 5,0 mg/ml. En una realización, está presente manitol en la composición de acuerdo con la invención en una cantidad de 5,0 mg/ml.

En una realización preferida, el único agente para ajuste de la tonicidad presente en la formulación de la invención es manitol.

65 En una realización preferida, la formulación de acuerdo con la invención no contiene glicina.

En una realización, la composición farmacéutica líquida de la invención contiene FSH o una variante de la misma en calidad de agente activo, polisorbato 20 y/o polisorbato 80 como tensioactivo, manitol como modificador de la tonicidad, fosfato como tampón, metionina como agente estabilizante y alcohol bencílico y cloruro de benzalconio como conservantes, y agua, sin más excipientes.

5 Tal como se ha indicado más arriba, la invención proporciona formulaciones líquidas para uso único y uso multi-dosis, que contienen una combinación de al menos dos agentes bacteriostáticos. Las formulaciones de la invención son adecuadas para uso farmacéutico o veterinario.

10 En una realización, la invención proporciona un artículo manufacturado para uso farmacéutico humano, que comprende el material de empaquetado y un recipiente que comprende una solución de FSH o variante de FSH y alcohol bencílico y cloruro de benzalconio, opcionalmente con sistemas de tampón y/u otros excipientes, en un diluyente acuoso, en donde dicho material de empaquetado comprende material escrito que indica que tal solución puede ser conservada durante un período de 24 horas o más después del primer uso. El recipiente es preferiblemente una jeringa, vial, frasco para infusión, ampolla o carpula. Muy preferiblemente, el recipiente es una carpula dentro de una pluma para inyección.

15 Antes del primer uso, es decir, antes de romper el precinto del recipiente, vial, ampolla, carpula o cartucho, las formulaciones de la invención se pueden conservar durante al menos exacta o aproximadamente 6 meses, 12 meses o 24 meses. En condiciones de almacenamiento preferido, las composiciones farmacéuticas de la invención se mantienen antes del primer uso alejadas de la luz brillante (preferiblemente en la oscuridad), a temperaturas de exacta o aproximadamente 2-8°C.

20 La formulación de la invención se puede administrar utilizando dispositivos reconocidos. Los ejemplos que comprenden estos sistemas de vial único incluyen dispositivos de inyector tipo pluma para el suministro de una solución tales como los conocidos como, o disponibles de, EasyJect[®], Gonal-F[®] Pen, Humaject[®], Novopen[®], B-D[®] Pen, AutoPen[®], Follistim[®]-Pen, Puregon[®]-Pen y OptiPen[®].

25 Se pueden proporcionar a los pacientes formulaciones conservadas estables, en forma de soluciones transparentes. La disolución puede estar destinada a un único uso, o bien puede ser reutilizada múltiples veces y puede ser suficiente para un único ciclo o múltiples ciclos de tratamiento del paciente, y proporciona así un régimen de tratamiento más conveniente que los actualmente disponibles.

30 La formulación acuosa de acuerdo con la invención es una disolución lista para usar, y no existe reconstitución del preparado de FSH en ningún momento.

35 La FSH o variante de FSH en la formulación conservada estable descrita en la presente memoria puede ser administrada a un paciente de acuerdo con la presente invención a través de una diversidad de métodos de aplicación, entre ellos la inyección subcutánea o intramuscular, la vía transdérmica, pulmonar, transmucosal, el implante, la bomba osmótica, cartucho, microbomba, la vía oral, o por otros medios apreciados por los expertos, como es bien conocido en la técnica.

40 Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar adicionalmente la preparación de las formulaciones y composiciones de la invención. No debe interpretarse que el alcance de la invención consiste simplemente en los siguientes ejemplos.

45 La invención se refiere también a un recipiente farmacéutico que contiene la composición farmacéutica líquida de la invención. Son conocidos en la técnica anterior recipientes farmacéuticamente adecuados. El recipiente puede ser, por ejemplo, una jeringa, vial, frasco para infusión, ampolla o carpula. En una realización preferida, cuando el recipiente es una jeringa, la jeringa está equipada con un sistema de protección de la aguja. Estos sistemas de protección de la aguja que son bien conocidos en la técnica ayudan a reducir el riesgo de lesiones. En otra realización, el recipiente es una carpula dentro de una pluma para inyección.

50 La invención también se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica líquida de acuerdo con la invención, en donde la FSH o variante de FSH en calidad de agente activo está formulada en un preparado acuoso que contiene cloruro de benzalconio y alcohol bencílico como conservantes y excipientes farmacéuticos adicionales.

55 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica líquida de acuerdo con la invención para la administración multi-dosis. La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse ventajosamente en el tratamiento de la infertilidad y otros trastornos relacionados con la FSH. En una realización preferida, la formulación de FSH de acuerdo con la invención se utiliza para el tratamiento de un ser humano. Sin embargo, en general, la composición farmacéutica de la invención también puede ser administrada a otros mamíferos, tales como ovejas, vacas, cerdos o caballos.

60 Se ha hallado que la formulación farmacéutica líquida de acuerdo con la invención presenta una estabilidad muy

satisfactoria frente al almacenamiento. En el marco de la presente invención, el término "estable frente al almacenamiento" se entiende con el significado de que el contenido de FSH o variante de FSH activa todavía asciende a 80% o más de la concentración inicial después de tres meses de almacenamiento de la formulación a 25°C. Preferiblemente, después de un almacenamiento durante tres meses a 25°C, el contenido restante de actividad de FSH todavía asciende al menos a 85%, más preferiblemente al menos 90%, y muy preferiblemente al menos 95% de la actividad original.

La actividad biológica de la FSH o variante de FSH se puede estimar mediante la comparación, en condiciones dadas, de su efecto en el engrosamiento de los ovarios de ratas inmaduras tratadas con gonadotropina coriónica frente el mismo efecto de un preparado de un estándar internacional o de un preparado de referencia calibrado en unidades internacionales (Farmacopea Europea, 5ª edición).

La medida de la actividad de FSH *in vitro* ha sido descrita, por ejemplo, por Albanese et al. (1994) Mol. Celular Endocrinol. 101:211-219.

La pureza de la FSH o variante de FSH utilizada en la formulación de acuerdo con la invención debe ser al menos 95%, preferiblemente al menos 97%, más preferiblemente al menos 99% y muy preferiblemente más del 99%. El grado de pureza puede ser determinado mediante análisis por HPLC. Se pueden obtener materiales adecuados y protocolos para llevar a cabo dicho análisis de proveedores comerciales tales como Vydac o TOSOH Bioscience.

Los componentes para formular las disoluciones de acuerdo con la invención se pueden obtener de fuentes convencionales, por ejemplo de empresas como Sigma o Merck.

La producción de la formulación de la invención se puede realizar conforme a métodos convencionales. Se pueden disolver los componentes de la formulación en un tampón acuoso. Como alternativa, la FSH o variante de FSH pueden haber sido ya obtenidas en un tampón acuoso como resultado del procedimiento de purificación.

Por último, la formulación líquida acabada se envasa en un recipiente farmacéutico adecuado, donde es almacenada hasta su administración.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la invención sin limitar su alcance.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de una FSH recombinante humana mediante tecnologías recombinantes

Se produce FSH recombinante humana en células hospedantes CHO transfectadas, mediante métodos habituales. Estos métodos incluyen la generación de un clon de células CHO que produce FSH recombinante humana a partir de una o más moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican la cadena α y la cadena β de la FSH humana, el cultivo de las células hospedantes en condiciones adecuadas y la purificación de la FSH recombinante humana a partir del cultivo celular. En el estado de la técnica están descritos procedimientos adecuados, tal como se ha mencionado antes.

En una realización preferida, la FSH recombinante humana se produce tal como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2009/000913.

Ejemplo 2

Formulación líquida de FSH

Se preparó una formulación líquida que comprende FSH recombinante humana formulando los siguientes componentes en una solución tampón acuosa de fosfato.

| | |
|-------------------------|-------------|
| Ingrediente | |
| FSH humana recombinante | 600 UI / ml |
| Polisorbato 20 | 0,2 mg / ml |
| Fosfato de sodio | 50 mM |
| Manitol | 5,0 mg/ml |
| L-Metionina | 0,5 mg/ml |
| Alcohol bencílico | 10,0 mg/ml |

| | |
|------------------------|------------|
| Cloruro de benzalconio | 0,02 mg/ml |
| Agua para inyección | |
| pH | 7,0 |

Se determinó la actividad biológica de la FSH recombinante humana, hallando un valor de aproximadamente 10.000 UI/mg.

- 5 Añadiendo NaOH se ajustó el valor del pH de la composición. Todos los ingredientes son de calidad conforme a la Farmacopea Europea (Ph. Eur.). La formulación tiene una tonicidad de 254 mOsmol/kg.

Además, se prepararon dos formulaciones de FSH de la técnica anterior como formulaciones comparativas:

- 10 A) Formulación comparativa Gonal-f: fosfato de sodio 10 mM, sacarosa 60 mg/ml, metionina 0,1 mg/ml, poloxámero 188 0,1 mg/ml, *m*-cresol 3 mg/ml, pH 7,0.
- B) Formulación comparativa Puregon: citrato de sodio 50 mM, sacarosa 50 mg/ml, metionina 0,5 mg/ml, polisorbato 20 0,2 mg/ml, alcohol bencílico 10 mg/ml, pH 7,0.

15 Ejemplo 3

Ensayos de estabilidad de las formulaciones de acuerdo con la presente invención

- 20 Se dividieron en alícuotas de 1 ml/vial los preparados acuosos descritos en el Ejemplo 2, y se guardaron a 2-8°C, a 25°C y a 37°C. Después de un período de almacenamiento de 12 semanas a 25°C y de 9 semanas a 37°C, se analizaron las muestras respecto a diversos parámetros de ensayo. Se ensayaron la conservación suficiente de acuerdo a la Farmacopea Europea, 5ª edición. El porcentaje de recuperación de FSH, porcentaje de disminución de FSH dímera (disociación de FSH en monómeros) y pureza de FSH se midieron mediante SE-HPLC y SDS-PAGE.

25 La formulación de la invención mostró más de 95% de recuperación de FSH recombinante humana tras el almacenamiento a 2-8°C, 25°C y 37°C. Además, la formulación mostró menos de 5% de disminución de FSH dímera tras el almacenamiento a 2-8°C, 25°C y 37°C. Además, la formulación presentaba más de 95% de pureza de FSH tras el almacenamiento a 2-8°C, 25°C y 37°C.

30 De estos resultados se puede deducir que la formulación acuosa de FSH que comprende polisorbato 20 como tensoactivo, manitol como modificador de la tonicidad, fosfato como tampón, metionina como agente estabilizante y alcohol bencílico y cloruro de benzalconio como conservantes de acuerdo con la invención previene la pérdida de proteína y la desnaturalización y disociación de la proteína en sus constituyentes monómeros, y estabiliza la FSH durante un período prolongado de tiempo. Además, debido a su favorable comportamiento de conservación, la formulación resulta un preparado útil para la administración multi-dosis.

40 La eficacia de conservación antimicrobiana de las formulaciones de FSH de acuerdo con la presente invención fue determinada con una prueba de exposición de acuerdo a la Farmacopea Europea, 5ª edición. La prueba consiste en comprometer a las composiciones de formulación acuosa con un inóculo de microorganismos definidos prescrito, guardar a una temperatura prescrita la formulación inoculada, tomar muestras de la formulación a intervalos específicos de tiempo y contar los microorganismos en las muestras tomadas. Las propiedades de conservación del preparado son adecuadas si se produce una disminución significativa del número de microorganismos, o al menos no se produce un aumento del mismo.

45 Las formulaciones de FSH de acuerdo con la presente invención han mostrado una disminución significativa en el número de microorganismos y, por tanto, han demostrado propiedades conservantes muy satisfactorias.

50 Además, se ha observado que las formulaciones de la presente invención presentan una estabilidad que es comparable a la estabilidad de las formulaciones comparativas de la técnica anterior Gonal-f y Puregon.

Listado de secuencias:

- 55 SEQ ID N° 1: secuencia de aminoácidos de la cadena α de FSH humana
- SEQ ID N° 2: secuencia de aminoácidos de la cadena β de FSH humana
- SEQ ID N° 3: secuencia de ácido nucleico de tipo natural que codifica la cadena α de FSH humana
- SEQ ID N° 4: secuencia de ácido nucleico de tipo natural que codifica la cadena β de FSH humana
- SEQ ID N° 5: secuencia de ácido nucleico optimizada en cuanto a codones que codifica la cadena β de FSH humana
- 60 SEQ ID N° 6: secuencia de ácido nucleico optimizada en cuanto a codones que codifica la cadena α de FSH humana

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Biogenerix AG
 <120> formulación líquida de FSH
 <130> B 8299
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.3

 10 <210> 1
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15 <220>
 <221> CADENA
 <222> (1) . . (116)
 <223> cadena alfa de FSH humana

 <400> 1
 Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
 1 5 10 15

 Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
 20 25 30

 Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
 35 40 45

 Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
 50 55 60

 Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
 65 70 75 80

 Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
 85 90 95

 Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
 100 105 110

 Tyr His Lys Ser
 115

 20 <210> 2
 <211> 129
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CADENA
 30 <222> (1) . . (129)
 <223> cadena beta de FSH humana

 <400> 2

ES 2 372 470 T3

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

Glu

- <210> 3
- <211> 369
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> características varias
- 10 <223> secuencia de ácido nucleico de tipo natural que codifica la cadena alfa de FSH humana

- <400> 3
- cttaattaag cgcagcat ggattactac agaaaatatg cagctatctt tctggtcaca 60
- ttgtcgggtgt ttctgcatgt tctccattcc gctcctgatg tgcaggattg cccagaatgc 120
- acgctacagg aaaaccatt cttctcccag ccgggtgccc caatacttca gtgcatgggc 180
- tgctgcttct cttagagcata tcccactcca ctaaggtcca agaagacgat gttggtccaa 240
- aagaacgtca cctcagagtc cacttgctgt gttagctaaat catataacag ggtcacagta 300
- atgggggggtt tcaaagtgga gaaccacacg gcgtgccact gcagtacttg ttattatcac 360
- aaatcttaa 369

- 15 <210> 4
- <211> 474
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 20 <220>
- <221> características varias
- <223> secuencia de ácido nucleico de tipo natural que codifica la cadena beta de FSH humana

- 25 <400> 4

ES 2 372 470 T3

aggatccccg ggctacctcc ccgcggggag gcgcgccct taattaagcc gccaccatga 60
 agacactcca gtttttcttc cttttctggt gctggaaagc aatctgctgc aatagctgtg 120
 agctgaccaa catcaccatt gcaatagaga aagaagaatg tcgtttctgc ataagcatca 180
 acaccacttg gtgtgctggc tactgctaca ccagggatct ggtgtataag gaccagcca 240
 ggcccaaat ccagaaaaca tgtacctca aggaactggt atatgaaaca gtgagagtgc 300
 ccggctgtgc tcaccatgca gattccttgt atacatacc agtggccacc cagtgtcact 360
 gtggcaagtg tgacagcgac agcactgatt gtactgtgcg aggcctgggg cccagctact 420
 gctcctttgg tgaatgaaa gaataaacat gccatggcat gcgagctcga attc 474

<210> 5
 <211> 471
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> secuencia de ácido nucleico optimizada en cuanto a codones que codifica la cadena beta de FSH humana

10

<400> 5
 aggatccccg ggtacctccc cgcggggagg gcgcgccctt aattaagccg ccaccatgaa 60
 gaccctgcag ttcttcttcc tgttctgctg ctggaaggcc atctgctgca acagctgcga 120
 gctgaccaac atcaccatcg ccatcgagaa ggaggagtgc aggttctgca tcagcatcaa 180
 caccacctgg tgcgccgat actgctacac cagggacctg gtgtacaagg accccgccag 240
 gcccaagatc cagaagacct gcaccttaa ggagctggtg tacgagaccg tgagggtgcc 300
 cggctgcgcc caccagccg acagcctgta cacctacccc gtggccacc agtgccactg 360
 cggcaagtgc gacagcgaca gcaccgactg caccgtgagg ggctgggcc ccagctactg 420
 cagcttcggc gagatgaagg agtaatgacc atggcatgcg agctcgaatt c 471

<210> 6
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> secuencia de ácido nucleico optimizada en cuanto a codones que codifica la cadena alfa de FSH humana

20

<400> 6
 cttaattaag ccgccagcat ggactactac aggaagtacg ccgccatctt cctggtgacc 60
 ctgagcgtgt tcctgcacgt gctgcacagc gccccagacg tgcaggactg ccccgagtgc 120
 accctgcagg agaaccatt cttcagccag cccggagccc ccatcctgca gtgcatgggc 180
 tgctgcttca gcagggccta cccaccccc ctgaggagca agaagaccat gctggtgacg 240
 aagaacgtga ccagcgagag cacctgctgc gtggccaaga gctacaacag ggtgaccgtg 300
 atggcgggct tcaaggtgga gaaccacacc gcctgccact gcagcacctg ctactaccac 360
 aagagctaat ga 372

25

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición farmacéutica líquida que comprende hormona estimulante del folículo (FSH) o una variante de la misma, y cloruro de benzalconio y alcohol bencílico, a la vez, como conservantes.
- 2.- Composición farmacéutica líquida según con la reivindicación 1, en donde está presente cloruro de benzalconio en una concentración de 0,005 - 0,03 mg/ml y está presente alcohol bencílico en una concentración de 5,0 a 12,0 mg/ml.
- 10 3.- Composición farmacéutica líquida según la reivindicación 1 ó 2, en donde está presente FSH o una variante de la misma en una concentración de 10 a 200 µg/ml.
- 4.- Composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además metionina como un antioxidante.
- 15 5.- Composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un tensioactivo.
- 20 6.- Composición farmacéutica líquida según la reivindicación 5, en donde el tensioactivo es un éster alquílico de polioxietilen-sorbitán.
- 7.- Composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un agente modificador de la tonicidad.
- 25 8.- Composición farmacéutica líquida según la reivindicación 7, en donde el agente modificador de la tonicidad es azúcar-alcohol o azúcar.
- 9.- Composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene un pH en el intervalo de 6,5 a 7,5.
- 30 10.- Composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un agente de tampón fisiológicamente aceptable.
- 35 11.- Composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene FSH o una variante de la misma como agente activo, polisorbato 20 y/o polisorbato 80 como tensioactivo, manitol como modificador de la tonicidad, fosfato como tampón, metionina como agente estabilizante y alcohol bencílico y cloruro de benzalconio como conservantes, sin más excipientes.
- 40 12.- Un recipiente farmacéutico que contiene una composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 13.- Método para preparar una composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde se formula FSH o una variante de la misma como agente activo en un preparado acuoso que comprende cloruro de benzalconio y alcohol bencílico, a la vez, como conservantes y otros excipientes farmacéuticos.
- 45 14.- Método para fabricar una composición farmacéutica empaquetada que comprende disponer una disolución que comprende FSH o una variante de la misma, y cloruro de benzalconio y alcohol bencílico en un vial, ampolla, carpula o cartucho.
- 50 15.- Uso de una composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso en administración multi-dosis.