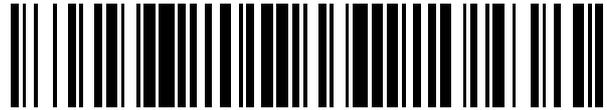


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 378**

51 Int. Cl.:

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 38/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2009 E 09824580 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2366401**

54 Título: **Composición acuosa que contiene hormona foliculoestimulante**

30 Prioridad:

04.11.2008 JP 2008283079

18.09.2009 JP 2009216563

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.10.2015

73 Titular/es:

ASKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
5-1, Shibaura 2-chome Minato-ku
Tokyo 108-8532, JP

72 Inventor/es:

ASADA, HAJIME y
KATAOKA, HIROSHIGE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 548 378 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

Composición acuosa que contiene hormona foliculoestimulante

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición acuosa estable que contiene hormona foliculoestimulante.

Antecedentes técnicos

10 La hormona foliculoestimulante (de aquí en adelante también abreviada como "FSH") es una hormona sintetizada y secretada por las células productoras de hormonas gonadotróficas de la hipófisis anterior. FSH tiene una acción de estimulación del crecimiento de folículos ováricos inmaduros y maduración de las células en el ovario. Como medicamento, FSH se ha usado como un agente inductor de la ovulación en la tecnología reproductiva asistida (ART).

15 Las preparaciones de gonadotropina menopáusica humana (hMG) extraídas de la orina de mujeres posmenopáusicas se han usado convencionalmente como composiciones que contienen FSH. Las preparaciones de hMG contienen FSH y hormona luteinizante (LH) en las que la proporción de actividad de FSH y LH es aproximadamente 1:1. En países extranjeros, "preparaciones de FSH recombinante" producidas por recombinación génica sin usar orina humana como materia prima se han usado principalmente recientemente, y también en Japón, Follistim (marca registrada) se aprobó en 2005. Puesto que estas preparaciones recombinantes no usan orina como una materia prima, estas se caracterizan en no contener impurezas y tener calidad consistente.

20 Las proteínas bioactivas generalmente son inestables en una solución acuosa, y esta tendencia aumenta cuando la pureza de una proteína se vuelve más alta. En soluciones acuosas, las proteínas se hidrolizan de la misma manera que compuestos de bajo peso molecular, así como producen cambios químicos tal como racemización, y producen además cambios de estructuras de orden superior (cambios físicos) ya que son compuestos poliméricos. Los ejemplos de tales cambios físicos incluyen desnaturalización, agregación, adsorción, precipitación. En el proceso del cambio físico, se considera que la desnaturalización se produce como un desencadenante, y tales fenómenos como agregación, adsorción y precipitación se producen posteriormente. La desnaturalización significa cambios de las estructuras tridimensionales (estructuras terciaria y cuaternaria) tal como el desplegamiento de las cadenas plegadas, y puesto que la desnaturalización produce pérdida de actividad fisiológica en la mayoría de los casos, es importante prevenir la desnaturalización para la estabilidad aumentada de preparaciones de proteínas o péptidos.

25 Para suprimir los cambios químicos y físicos en las preparaciones de proteínas, generalmente se han añadido proteínas contaminantes tal como seroalbúmina humana como un agente estabilizante. Sin embargo, para evitar el riesgo de contaminación de virus y similares, el uso de preparaciones recombinantes se ha vuelto recientemente la corriente principal. Para las preparaciones recombinantes, se han examinado varios métodos de estabilización como sustitutos para la adición de proteínas contaminantes.

30 Por ejemplo, se ha investigado aumentar la estabilidad de preparaciones de proteínas añadiendo un compuesto que tiene una acción de formar un enlace de hidrógeno con una molécula de proteína o potenciar la hidratación de una molécula de proteína, tal como sacáridos, tensioactivos y aminoácidos (véase, por ejemplo, Bull. Chem. Soc. Jpn., 53, pp. 2451-2455, 1980; J. Biol. Chem., 256, pp.7193-7201, 1981; Pharm. Res., 10, pp. 954-962, 1993; Int. J. Pharm., 96, pp. 41-49, 1993; Pharm. Res., 8, pp. 1258-1263, 1991; Pharm. Res., 10, pp. 649-659, 1993, y similares). Respecto a los aminoácidos entre tales compuestos, el documento DE-A-2916711, por ejemplo, divulga que glicina, α - y β -alanina, prolina, glutamina, y similares tienen un efecto de estabilización para los factores de coagulación de la sangre, y la patente en EE UU No. 4.440.679 describe que arginina, lisina y/o glicina tienen un efecto estabilizador para el factor VIII, fibronectina, y similares. El documento DE-A-1985644 también divulga que arginina, lisina, histidina, fenilalanina, triptófano, tirosina, ácido aspártico, y/o ácido glutámico tienen un efecto de estabilización para antitrombina III. Sin embargo, los efectos de estabilización de estos aminoácidos son específicos para las proteínas o péptidos diana, y por tanto, no se pueden predecir los aminoácidos o combinaciones de dos o más tipos de aminoácidos que tienen el efecto de estabilización más eficaz para proteínas arbitrarias a partir de estos descubrimientos.

35 Respecto a FSH, por ejemplo, se describe en el documento de patente 1 que metionina estabiliza la gonadotropina en una composición acuosa. Además, respecto al efecto de estabilización de histidina para proteínas, se sabe que, por ejemplo, histidina tiene un efecto de estabilización en preparaciones líquidas de proteínas relacionadas con factores de coagulación de la sangre (documento de patente 2), inmunoglobulina (documento de patente 3), eritropoyetina (documento de patente 4). Además, el documento de patente 5 divulga una preparación de FSH que contiene glicina, metionina, un tensioactivo no iónico, y un agente tamponante de fosfato como agentes estabilizantes. Sin embargo, no se sabe hasta ahora si la histidina tiene un efecto de estabilización para FSH en una composición acuosa. Tampoco se sabe si una combinación de histidina y otro aminoácido tiene efecto de estabilización para FSH en una composición acuosa.

Referencias del estado de la técnica

Documentos de patente

- 5 Documento de patente 1: Publicación no examinada de patente japonesa (KOKAI) No. 10-203997
 Documento de patente 2: Publicación no examinada de patente japonesa (KOKAI) No. 2002-275090
 Documento de patente 3: Publicación no examinada de patente japonesa (KOHYO) No. 2007-511566
 Documento de patente 4: Publicación de patente internacional WO02/011753
 Documento de patente 5: Publicación no examinada de patente japonesa (KOHYO) No. 2009-509953
 10 Documento de patente 6: DE-A-2916711
 Documento de patente 7: Patente en EE UU No. 4.440.679
 Documento de patente 8: DE-A-1985644

Documentos no de patente

- 15 Documento no de patente 1: Bull. Chem. Soc. Jpn., 53, pp.2451-2455, 1980
 Documento no de patente 2: J. Biol. Chem., 256, pp.7193-7201, 1981
 Documento no de patente 3: Pharm. Res., 10, pp.954-962, 1993
 Documento no de patente 4: Int. J. Pharm., 96, pp.41-49, 1993
 20 Documento no de patente 5: Pharm. Res., 8, pp.1258-1263, 1991
 Documento no de patente 6: Pharm. Res., 10, pp.649-659, 1993

25 El documento WO 2004/087213 A1 describe formulaciones farmacéuticas de hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), y mezclas de FSH y hormona luteinizante (LH), y a métodos de producir tales formulaciones.

30 El documento WO2008/084237 A2 describe una composición acuosa que tiene solubilidad de proteína aumentada obtenida mediante: a. determinar un pH al que la proteína tiene estabilidad a la temperatura deseada; b. añadir a la composición al menos un tampón de desplazamiento en donde el tampón de desplazamiento tiene un pKa que es al menos 1 unidad mayor o menos que el pH del paso (a); y c. ajustar el pH de la composición al pH del paso (a); en donde la composición acuosa no comprende un tampón convencional a una concentración mayor de aproximadamente 2 mM y en donde el tampón convencional tiene un pKa que está en de 1 unidad del pH del paso (a).

35 Compendio de la invención

Objeto que se va a lograr por la invención

40 Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición acuosa que contiene hormona foliculoestimulante y metionina. Más específicamente, el objeto de la presente invención es proporcionar un medio para estabilizar la hormona foliculoestimulante en una composición acuosa usando un aminoácido.

Medios para alcanzar el objeto

45 Los inventores de la presente invención realizaron varias investigaciones sobre sustancias que estabilizan la hormona foliculoestimulante en el estado de una solución acuosa, y encontraron que la histidina tenía un efecto de estabilización extremadamente superior, y alcanzó el efecto de solubilización más alto adicional cuando se combina apropiadamente con otro aminoácido, sacárido, tampón, o similar. La presente invención se logró en base a los descubrimientos anteriormente mencionados.

50 La presente invención, por tanto, proporciona una composición acuosa que comprende hormona foliculoestimulante e histidina y metionina como un agente estabilizante.

55 Según formas de realización preferidas de la presente invención, se proporciona la composición acuosa anteriormente mencionada, en donde la concentración de histidina es de 0,05 a 10,0 mg/ml; la composición acuosa anteriormente mencionada, en donde la concentración de histidina es de 0,2 a 5,0 mg/ml; y la composición acuosa anteriormente mencionada, en donde la concentración de histidina es de 0,25 a 2,0 mg/ml. Según una forma de realización preferida de la presente invención, también se proporciona la composición acuosa anteriormente mencionada, en donde la concentración de metionina es de 0,05 a 10,0 mg/ml; la composición acuosa anteriormente mencionada, en donde la concentración de metionina es de 0,2 a 5,0 mg/ml; y la composición acuosa anteriormente mencionada, en donde la concentración de metionina es de 0,25 a 2,0 mg/ml. Además, también se proporciona la composición acuosa anteriormente mencionada, que comprende una hormona foliculoestimulante humana recombinante como la hormona foliculoestimulante.

65 Según formas de realización preferidas de la presente invención, se proporciona la composición acuosa anteriormente mencionada, que comprende además uno o dos o más tipos de sustancias seleccionadas del grupo

que consiste en un sacárido, propilenglicol, y creatinina; y la composición acuosa anteriormente mencionada que comprende además uno o dos o más tipos de sustancias seleccionadas del grupo que consiste en xilitol, inositol, propilenglicol, sacarosa, gluconato de calcio, gluconato de sodio, manitol, macrogol 600 y creatinina.

5 Según una forma de realización más preferida de la presente invención, se proporciona la composición acuosa anteriormente mencionada, que comprende además un tensioactivo. Según formas de realización más preferidas de la presente invención, se proporciona la composición acuosa anteriormente mencionada, en donde el tensioactivo es un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en un tensioactivo iónico, un tensioactivo anfótero, y un
10 tensioactivo no iónico; la composición acuosa anteriormente mencionada en donde el tensioactivo es un tensioactivo no iónico; la composición acosa anteriormente mencionada en donde el tensioactivo consiste en Tween 80 y/o Tween 20; y la composición acuosa anteriormente mencionada en donde el tensioactivo es Tween 80.

Según otra forma de realización preferida de la presente invención, se proporciona la composición acuosa anteriormente mencionada, que comprende además un agente tamponante. Según formas de realización más
15 preferidas, se proporciona la composición acuosa anteriormente mencionada que comprende un agente tamponante seleccionado del grupo que consiste en un agente tamponante fosfato, un agente tamponante citrato, un agente tamponante acetato, un agente tamponante borato, un agente tamponante tartrato y un agente tamponante tris; la composición acuosa anteriormente mencionada, que comprende un agente tamponante fosfato o un agente tamponante citrato; la composición acuosa anteriormente mencionada, que tiene un valor de pH de 6,5 a 8,0, preferiblemente de 7,0 a 7,8; la composición acuosa anteriormente mencionada que comprende un agente de
20 tonicidad; la composición acuosa anteriormente mencionada, en donde el agente de tonicidad es cloruro de sodio; la composición acuosa anteriormente mencionada que comprende además un ácido policarboxílico seleccionado del grupo que consiste en EDTA, ácido cítrico, ácido fítico, ácido málico y ácido glucónico; la composición acuosa anteriormente mencionada, en donde el ácido policarboxílico es EDTA; y la composición acuosa anteriormente
25 mencionada, en donde el medio acuoso es solución salina tamponada con fosfato.

Desde otro aspecto de la presente invención, se proporciona un agente para su uso en estabilizar una composición farmacéutica acuosa que contiene hormona foliculoestimulante como principio activo, que comprende histidina y metionina como agente estabilizante.
30

Desde aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para estabilizar una solución acuosa que contiene hormona foliculoestimulante como un principio activo, que comprende el paso de añadir histidina y metionina a la solución acuosa; y el método anteriormente mencionado, que comprende el paso de añadir histidina y metionina.
35

Efecto de la invención

En la composición acuosa de la presente invención, la hormona foliculoestimulante se estabiliza con histidina y metionina, y por tanto los cambios químicos y físicos de la hormona foliculoestimulante sustancialmente se reducen o eliminan. Por tanto, la composición es útil como una composición farmacéutica estable en la que la reducción de la actividad de la hormona se elimina durante el almacenamiento y distribución.
40

Breve descripción de las figuras

45 [Fig. 1] La figura 1 es una vista aumentada de las gráficas de HPLC obtenidas para composiciones que contienen hormona foliculoestimulante alrededor de los picos de la subunidad α y subunidad β . Las gráficas se obtuvieron para una composición preparada añadiendo una FSH recombinante genética a 150 UI/ml, sacarosa a 50 mg/ml y Tween 80 al 0,01% a PBS 10 mM, y añadiendo además histidina a la mezcla, después del almacenamiento de las mismas a 40°C durante 8 semanas, y una composición preparada añadiendo FSH recombinante genética a 150 UI/ml y Tween
50 80 al 0,01% a PBS 10 mM, después de almacenamiento de la misma a 5°C o 40°C durante 8 semanas.

[Fig. 2] La figura 2 es una vista aumentada de las gráficas de HPLC obtenidas para composiciones que contienen hormona foliculoestimulante alrededor de los picos de la subunidad α y subunidad β . Las gráficas se obtuvieron para una composición preparada añadiendo una FSH recombinante genética a 150 UI/ml, sacarosa a 50 mg/ml y Tween
55 80 al 0,01% a PBS 10 mM, y añadiendo además metionina a la mezcla, después del almacenamiento de las mismas a 40°C durante 8 semanas, y una composición preparada añadiendo FSH recombinante genética a 150 UI/ml y Tween 80 al 0,01% a PBS 10 mM, después de almacenamiento de la misma a 5°C o 40°C durante 8 semanas.

[Fig. 3] La figura 3 es una vista aumentada de las gráficas de HPLC obtenidas para composiciones que contienen hormona foliculoestimulante alrededor de los picos de la subunidad α y subunidad β . Las gráficas se obtuvieron para una composición preparada añadiendo una FSH recombinante genética a 150 UI/ml, sacarosa a 50 mg/ml y Tween
60 80 al 0,01% a PBS 10 mM, y añadiendo además metionina e histidina a la mezcla, después del almacenamiento de las mismas a 40°C durante 8 semanas, y una composición preparada añadiendo FSH recombinante genética a 150 UI/ml y Tween 80 al 0,01% a PBS 10 mM, después de almacenamiento de la misma a 5°C o 40°C durante 8
65 semanas.

Modos para llevar a cabo la invención

En la presente invención, también se puede usar hormona foliculoestimulante natural separada de orina humana. El efecto de la presente invención se muestra notablemente donde se usa hormona foliculoestimulante muy purificada. Según esto, es preferible usar hormona foliculoestimulante muy purificada, preferiblemente hormona foliculoestimulante muy purificada que sustancialmente consiste en la sustancia única. Según la presente invención, es preferible usar, desde el punto de vista anterior, hormona foliculoestimulante humana preparada por una técnica de recombinación genética y sustancialmente libre de proteínas contaminantes como la hormona foliculoestimulante.

Una concentración de la hormona foliculoestimulante en la composición acuosa de la presente invención no está particularmente limitada. La concentración es, por ejemplo, de aproximadamente 50 a 500 UI/ml, preferiblemente aproximadamente de 100 a 300 UI/ml. La unidad internacional (UI) de hormona foliculoestimulante se describe en el documento sobre estándar internacional de FSH por NIBSC (Instituto Nacional para Estándares Biológicos y Control, <http://www.nibsc.ac.uk/documents/ifu/98704.pdf>), o similar

Una concentración de histidina en la composición acuosa de la presente invención tampoco está particularmente limitada. La concentración es, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 10,0 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,2 a 5,0 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,25 a 2,0 mg/ml. Aunque una concentración de metionina en la composición acuosa de la presente invención tampoco está particularmente limitada, la concentración es, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 10,0 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,2 a 5,0 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,25 a 2,0 mg/ml.

La composición acuosa de la presente invención puede contener además un tipo o dos o más tipos de sustancias seleccionadas del grupo que consiste en un sacárido, propilenglicol y creatinina. Como el sacárido, se pueden usar monosacáridos, disacáridos, polioles, ácidos aldónicos y sales de los mismos, ciclítoles, macrogoles. Los ejemplos de los monosacáridos incluyen, por ejemplo, glucosa, manosa, galactosa, fructosa, xilosa, treosa, los ejemplos de los disacáridos incluyen, por ejemplo, sacarosa, maltosa, lactosa, celobiosa, trehalosa, y los ejemplos de los polioles incluyen, por ejemplo, manitol, xilitol, sorbitol, eritritol, glicerol. Los ejemplos de los ácidos aldónicos o sales de los mismos incluyen, por ejemplo, ácido glucónico, ácido galactónico, ácido manónico, y sales de los mismos, los ejemplos de los ciclítoles incluyen inositol, y los ejemplos de los macrogoles incluyen, por ejemplo, macrogol 200, macrogol 300, macrogol 400, macrogol 600, macrogol 100, macrogol 1500, macrogol 1540, macrogol 4000, macrogol 6000, macrogol 10000, macrogol 20000.

La composición acuosa de la presente invención puede contener preferiblemente uno o dos o más tipos de sustancias seleccionadas del grupo que consiste en xilitol, inositol, propilenglicol, sacarosa, gluconato de calcio, gluconato de sodio, manitol, macrogol 600 y creatinina.

Cuando la composición acuosa de la presente invención contiene sacarosa, manitol o inositol como el sacárido, el sacárido se puede usar a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 25 a 125 mg/ml, y se puede añadir preferiblemente a una concentración de aproximadamente 50 a 100 mg/ml. Cuando está contenido xilitol como el sacárido, el xilitol se puede usar a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 1 a 100 mg/ml, y se puede añadir preferiblemente a una concentración de aproximadamente 5 a 75 mg/ml. Cuando está contenido gluconato de calcio o gluconato de sodio como el sacárido, el gluconato se puede usar a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 0,2 a 75 mg/ml, y se puede añadir preferiblemente a una concentración de 1 a 50 mg/ml. Cuando está contenido macrogol 600 como el sacárido, el tensioactivo se puede usar a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 0,2 a 75 mg/ml, y se puede añadir preferiblemente a una concentración de 1 a 50 mg/ml. Cuando está contenido propilenglicol, el glicol se puede usar a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 1 a 100 mg/ml, y se puede añadir preferiblemente a una concentración de aproximadamente 5 a 75 mg/ml. Cuando está contenida creatinina, la creatinina se puede usar a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a 50 mg/ml, y se puede añadir preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,5 a 30 mg/ml.

La composición acuosa de la presente invención puede contener un tipo o dos o más tipos de tensioactivos. Aunque el tipo de tensioactivo no está particularmente limitado, se pueden usar un tipo o dos o más tipos de tensioactivo seleccionados del grupo que consiste en un tensioactivo iónico, un tensioactivo anfófico, y un tensioactivo no iónico. Aunque la concentración del tensioactivo no está particularmente limitada, el tensioactivo se puede usar a una concentración de aproximadamente el 0,001 al 0,1% y se puede añadir preferiblemente a una concentración de aproximadamente el 0,005 al 0,05%, basado en volumen total de la composición acuosa.

Los ejemplos del tensioactivo iónico incluyen, por ejemplo, ácido cólico, ácido desoxicólico, los ejemplos del tensioactivo anfófico incluyen, por ejemplo, CHAPS (3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato), CHAPSO (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-1-propanosulfonato), y los ejemplos del tensioactivo no iónico incluyen, por ejemplo, los de Tween (marca registrada), TRITON (marca registrada), PLURONIC (marca registrada), Carbowax (marca registrada). Los nombres mencionados como ejemplos específicos del tensioactivo no iónico son los que representan series de tensioactivos. Por ejemplo, los tensioactivos Tween incluyen esos con nombres de productos de Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80. Entre ellos, los tensioactivos no iónicos se

usan preferiblemente en la presente invención. Entre los tensioactivos no iónicos, Tween 20 y Tween 80 son más preferidos, y Tween 80 es especialmente preferido.

5 La composición acuosa de la presente invención puede contener además un agente tamponante, y la composición puede contener, por ejemplo, un agente tamponante seleccionado del grupo que consiste en un agente tamponante fosfato, un agente tamponante citrato, un agente tamponante acetato, un agente tamponante borato, un agente tamponante tartrato, y un agente tamponante tris, y un agente tamponante citrato o un agente tamponante fosfato pueden estar contenidos preferiblemente.

10 Cuando se usa un agente tamponante citrato, el agente se puede usar a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 10 a 250 mM, y se puede añadir preferiblemente a una concentración de aproximadamente 25 a 75 mM. Cuando se usa un agente tamponante fosfato o solución salina tamponada con fosfato, el agente se puede usar a una concentración de, por ejemplo, 2 a 50 mM, y se puede añadir preferiblemente a una concentración de aproximadamente 5 a 15 mM. Aunque el pH de la composición acuosa de la presente invención no está particularmente limitada, la composición se puede preparar para que tenga un valor de pH de, por ejemplo, 6,5 a 8,0, preferiblemente de 7,0 a 7,8, y se puede ajustar para tener un valor de pH deseado con un modificador de pH apropiado tal como ácido clorhídrico e hidróxido de sodio. La composición acuosa de la presente invención preferiblemente se prepara de modo que sea isotónica con los líquidos corporales, y puede contener un agente de tonicidad para este fin. Como el agente de tonicidad, por ejemplo, se puede usar cloruro de sodio, glicerol, y cloruro de sodio se puede usar preferiblemente.

15 La composición acuosa de la presente invención puede contener un ácido policarboxílico seleccionado del grupo que consiste en EDTA, ácido cítrico, ácido fítico, ácido málico, y ácido glucónico, y preferiblemente puede contener EDTA. Cuando un agente quelante está contenido, el agente se puede usar a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a 10,0 mg/ml, y se puede añadir preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,2 a 5,0 mg/ml.

20 Como medio acuoso de la composición acuosa de la presente invención, por ejemplo, se puede usar agua, agua destilada para inyección, solución salina fisiológica, tampón fosfato, solución salina tamponada con fosfato, y solución salina tamponada con fosfato se puede usar preferiblemente.

25 Aunque el método para preparar la composición acuosa de la presente invención no está particularmente limitado, la composición se puede preparar, por ejemplo, disolviendo la hormona foliculoestimulante e histidina en un medio acuoso apropiado tal como agua, agua destilada para inyección, solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato, y opcionalmente añadiendo uno o dos o más tipos de aminoácidos, sacáridos, propilenglicol, creatinina, tensioactivos, agentes tamponantes, modificadores de pH, agentes de tonicidad, explicados anteriormente, según se requiera. La composición se puede someter a un proceso de esterilización tal como esterilización por filtración según se requiera para preparar una composición acuosa para inyección. La composición acuosa de la presente invención se puede usar como una composición farmacéutica para inyección para, por ejemplo, tratamiento de infertilidad.

Ejemplos

30 La presente invención se explicará más específicamente con referencia a los ejemplos.

35 Ejemplo 1: Examen de la proporción restante para aminoácido

40 Se prepararon composiciones acuosas añadiendo una FSH recombinante genética a 150 UI/ml, sacarosa a 50 mg/ml y Tween 80 al 0,01% a un tampón citrato 50 mM, solución salina tamponada con fosfato (PBS) 10 mM o tampón fosfato (PB) 10 mM, y añadiendo además aminoácidos (concentración: 0,5 mg/ml) a la mezcla en tales combinaciones con los tampones como se muestra en la tabla 1 mencionada a continuación. Se puso una porción de 0,5 ml de cada composición acuosa en un envase de 2 ml de volumen, se selló, y almacenó a 50°C durante dos semanas. Después de las dos semanas, se midió la cantidad de FSH mediante un inmunoensayo, y se calculó una proporción de la misma respecto a la cantidad de FSH medida al inicio del experimento (proporción restante). Los resultados se muestran en la tabla 1 mencionada a continuación.

[Tabla 1]

Ejemplo de prueba No.	Aminoácido (0,5 mg/ml)	Agente tamponante	Proporción restante
Ejemplo comparativo 1-1	Histidina	Citrato (50 mM, pH 7,4)	71%
Ejemplo comparativo 1-2		PBS (10 mM, pH 7,4)	76%
Ejemplo comparativo 1-3		PB (10 mM, pH 7,4)	60%
Ejemplo comparativo 1-1	Metionina	Citrato (50 mM, pH 7,4)	69%
Ejemplo comparativo 1-2		PBS (10 mM, pH 7,4)	70%
Ejemplo comparativo 1-3	Aspartato de sodio	PBS (10 mM, pH 7,4)	56%

Ejemplo de prueba No.	Aminoácido (0,5 mg/ml)	Agente tamponante	Proporción restante
Ejemplo comparativo 1-4	Alanina	"	55%
Ejemplo comparativo 1-5	Clorhidrato de cisteína	"	2%
Ejemplo comparativo 1-6	Glicina	"	70%
Ejemplo comparativo 1-7	Glutamina	"	60%
Ejemplo comparativo 1-8	Clorhidrato de ácido glutámico	"	56%
Ejemplo comparativo 1-9	Glutamato de sodio	"	54%
Ejemplo comparativo 1-10	Glutatión oxidado	"	59%
Ejemplo comparativo 1-11	Cisteína	"	38%
Ejemplo comparativo 1-12	Diclorhidrato de cisteína	"	43%
Ejemplo comparativo 1-13	Ácido cisteico	"	47%
Ejemplo comparativo 1-14	Serina	"	54%
Ejemplo comparativo 1-15	Tirosina	"	40%
Ejemplo comparativo 1-16	Triptófano	"	41%
Ejemplo comparativo 1-17	Fenilalanina	"	44%
Ejemplo comparativo 1-18	Prolina	"	52%
Ejemplo comparativo 1-19	Leucina	"	58%

Ejemplo 2: Examen de la proporción restante para combinación de aminoácidos

5 Se prepararon composiciones acuosas añadiendo una FSH recombinante genética a 150 UI/ml, sacarosa a 50 mg/ml y Tween 80 al 0,01% a PBS 10 mM, y añadiendo además histidina y/o metionina a la mezcla como se muestra en la tabla 2 mencionada a continuación en las respectivas concentraciones. Como control, se preparó una composición acuosa añadiendo una FSH recombinante genética a 150 UI/ml y Tween 80 al 0,01% a PBS 10 mM. Se puso una porción de 0,5 ml de cada composición acuosa en un envase de 2 ml de volumen, se selló, y almacenó a 40°C durante 8 semanas. Al inicio del experimento, y después de 5 semanas y 8 semanas, cada 10 composición acuosa se analizó por HPLC de fase reversa (las gráficas de HPLC obtenidas después de 8 semanas se muestran en las figuras 1 a 3), y los valores obtenidos de las áreas de pico de la subunidad α y la subunidad β se corrigieron en base a los valores de áreas de picos de las subunidades obtenidos con un muestra estándar de FSH (solución de FSH recombinante genética 10 μ g/ml congelada almacenada a -80°C, descongelada antes del uso). A 15 continuación, se calcularon las proporciones restantes de las subunidades en las composiciones acuosas después de los periodos como proporciones de las cantidades medidas después de los periodos respecto a las cantidades medidas al inicio del experimento. Las cantidades de FSH se calcularon sumando los valores del área del pico de las subunidades. Los resultados se muestran en la tabla 2 mencionada a continuación.

[Tabla 2]

Ejemplo de prueba No.	Aminoácido	Proporción restante (%)		
			5 semanas	8 semanas
Ejemplo comparativo 2-1	Histidina (0,5 mg/ml)	subunidad α	86,3	79,8
		subunidad β	87,8	86,6
		FSH	87,1	83,4
Ejemplo comparativo 2	Metionina (0,5 mg/ml)	subunidad α	112,1	104,9
		subunidad β	87,0	70,6
		FSH	99,2	87,2
Ejemplo 2-2	Histidina (0,5 mg/ml) + Metionina (0,5 mg/ml)	subunidad α	112,2	110,0
		subunidad β	98,2	93,8
		FSH	104,8	101,5
Control	-	subunidad α	60,3	56,0
		subunidad β	44,0	39,0
		FSH	51,7	47,1

25 De estos resultados de medidas, se puede entender que histidina y metionina muestra alto efecto de estabilización para la subunidad α y la subunidad β , respectivamente. Además, la preparación de FSH que contenía tanto histidina como metionina como agentes estabilizantes era extremadamente estable.

Ejemplo comparativo 3: Examen de la proporción restante para la concentración de histidina

30 Se prepararon composiciones acuosas añadiendo una FSH recombinante genética a 150 UI/ml, sacarosa a 50 mg/ml y Tween 80 al 0,01% a un tampón citrato 50 mM o PBS 10 mM, y añadiendo además histidina a la mezcla en las combinaciones mostradas en la tabla 3 mencionada a continuación, y se examinó la proporción restante de la misma manera que la del ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 3 mencionada a continuación.

[Tabla 3]

Ejemplo de prueba No.	Concentración de histidina	Tampón	Proporción restante
Ejemplo 3-1	0 mg/ml	PBS (10 mM, pH 7,4)	60%
Ejemplo 3-2	0,2 mg/ml	Citrato (50 mM, pH 7,4)	71%
Ejemplo 3-3		PBS (10 mM, pH 7,4)	68%
Ejemplo 1-1	0,5 mg/ml	Citrato (50 mM, pH 7,4)	71%
Ejemplo 1-2		PBS (10 mM, pH 7,4)	76%
Ejemplo 1-3		PB (10 mM, pH 7,4)	60%
Ejemplo 3-4	1,0 mg/ml	Citrato (50 mM, pH 7,4)	74%
Ejemplo 3-5		PBS (10 mM, pH 7,4)	73%
Ejemplo 3-6	2,0 mg/ml	Citrato (50 mM, pH 7,4)	71%
Ejemplo 3-7		PBS (10 mM, pH 7,4)	75%
Ejemplo 3-8	3,2 mg/ml	Citrato (50 mM, pH 7,4)	74%
Ejemplo 3-9		PBS (10 mM, pH 7,4)	70%

Ejemplo comparativo 4: Examen y comparación de la proporción restante para sacárido

- 5 Se prepararon composiciones acuosas añadiendo una FSH recombinante genética a 150 UI/ml, histidina a 0,5 mg/ml y Tween 80 al 0,01% a un tampón citrato 50 mM o PBS 10 mM, y añadiendo además un sacárido, propilenglicol o creatinina a la mezcla en las combinaciones mostradas en la tabla 4 mencionada a continuación, y se examinó la proporción restante de la misma manera que la del ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 4 mencionada a continuación. También se muestran los resultados obtenidos al no añadir histidina como ejemplos comparativos.

10

[Tabla 4]

Ejemplo de prueba No.	Sacárido (concentración)	Tampón	Proporción restante
Ejemplo 1-1	Sacarosa (50 mg/ml)	Citrato (50 mM, pH 7,4)	71%
Ejemplo 1-2	"	PBS (10 mM, pH 7,4)	76%
Ejemplo 4-1	Sacarosa (10 mg/ml)	"	70%
Ejemplo 4-2	Inositol (50 mg/ml)	Citrato (50 mM, pH 7,4)	79%
Ejemplo 4-3	"	PBS (10 mM, pH 7,4)	78%
Ejemplo 4-4	Inositol (10 mg/ml)	"	70%
Ejemplo 4-5	Xilitol (50 mg/ml)	Citrato (50 mM, pH 7,4)	79%
Ejemplo 4-6	"	PBS (10 mM, pH 7,4)	81%
Ejemplo 4-7	Xilitol (10 mg/ml)	"	64%
Ejemplo 4-8	Glicerol (50 mg/ml)	"	37%
Ejemplo 4-9	Glucosa (50 mg/ml)	"	56%
Ejemplo 4-10	Gluconato de calcio (1 mg/ml)	Citrato (50 mM, pH 7,4)	70%
Ejemplo 4-11	"	PBS (10 mM, pH 7,4)	73%
Ejemplo 4-12	Gluconato de calcio (0,2 mg/ml)	"	68%
Ejemplo 4-13	Creatinina (25 mg/ml)	"	69%
Ejemplo 4-14	Creatinina (5 mg/ml)	"	71%
Ejemplo 4-15	Sorbitol (50 mg/ml)	"	67%
Ejemplo 4-16	Dextrano 70 (50 mg/ml)	"	59%
Ejemplo 4-17	Fructosa (50 mg/ml)	"	21%
Ejemplo 4-18	Propilenglicol (50 mg/ml)	"	78%
Ejemplo 4-19	Macrogol 400 (50 mg/ml)	"	67%
Ejemplo 4-20	Macrogol 600 (50 mg/ml)	Citrato (50 mM, pH 7,4)	67%
Ejemplo 4-21	"	PBS (10 mM, pH 7,4)	72%
Ejemplo 4-22	Macrogol 600 (10 mg/ml)	"	67%
Ejemplo 4-23	Macrogol 4000 (50 mg/ml)	"	61%
Ejemplo 4-24	Maltosa (50 mg/ml)	"	58%
Ejemplo 4-25	Manitol (50 mg/ml)	Citrato (50 mM, pH 7,4)	80%
Ejemplo 4-26	"	PBS (10 mM, pH 7,4)	73%
Ejemplo 4-27	Manitol (10 mg/ml)	"	70%
Ejemplo 4-28	Lactosa (50 mg/ml)	"	54%
Ejemplo 4-1	Sacarosa (50 mg/ml)	"	60%
Ejemplo 4-2	Inositol (50 mg/ml)	"	56%
Ejemplo 4-3	Xilitol (50 mg/ml)	"	63%
Ejemplo 4-4	Gluconato de calcio (1 mg/ml)	"	76%
Ejemplo 4-5	Gluconato de calcio (0,2 mg/ml)	"	55%
Ejemplo 4-6	Creatinina (25 mg/ml)	"	54%

Ejemplo de prueba No.	Sacárido (concentración)	Tampón	Proporción restante
Ejemplo 4-7	Creatinina (5 mg/ml)	"	61%
Ejemplo 4-8	Macrogol 600 (50 mg/ml)	"	32%
Ejemplo 4-9	Macrogol 600 (10 mg/ml)	"	71%
Ejemplo 4-10	Manitol (50 mg/ml)	"	64%

Ejemplo comparativo 5: Examen y comparación de la proporción restante para tensioactivo

5 Se prepararon composiciones acuosas añadiendo una FSH recombinante genética a 150 UI/ml, histidina a 0,5 mg/ml y sacarosa a 50 mg/ml a un tampón citrato 50 mM, PBS 10 mM o PB 10 mM, y añadiendo además un tensioactivo a la mezcla en tales combinaciones con los tampones como se muestra en la tabla 5 mencionada a continuación, y se examinaron las proporciones restantes de FSH en las composiciones de la misma manera que la del ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 5 mencionada a continuación. Los resultados obtenidos

10 añadiendo 0,5 mg/ml de metionina en lugar de 0,5 mg/ml de histidina también se muestran como ejemplos comparativos. La estabilidad se indicó como la proporción de la cantidad de FSH medida 2 semanas después del inicio del experimento respecto a la cantidad de FSH medida al inicio del experimento. Cuando no se añadió tensioactivo, tuvo lugar la adsorción o similar cuando las composiciones se pusieron en viales, y la cantidad de FSH se redujo a aproximadamente el 80% de la observada añadiendo un tensioactivo en ese momento.

15 [Tabla 5]

Ejemplo No.	Tensioactivo	Agente tamponante	Proporción restante
Ejemplo 1-1	Tween 80 (0,01%)	Citrato (50 mM, pH 7,4)	71%
Ejemplo 1-2		PBS (10 mM, pH 7,4)	76%
Ejemplo 1-3		PS (10 mM, pH 7,4)	60%
Ejemplo 1-1		Citrato (50 mM, pH 7,4)	69%
Ejemplo 1-2		PBS (10 mM, pH 7,4)	70%
Ejemplo 5-1	Tween 20 (0,01%)	Citrato (50 mM, pH 7,4)	77%
Ejemplo 5-2		PBS (10 mM, pH 7,4)	73%
Ejemplo 5-3		PS (10 mM, pH 7,4)	58%
Ejemplo 5-1		Citrato (50 mM, pH 7,4)	72%
Ejemplo 5-4	Ninguno	PBS (10 mM, pH 7,4)	65%
Ejemplo 5-5		PS (10 mM, pH 7,4)	46%

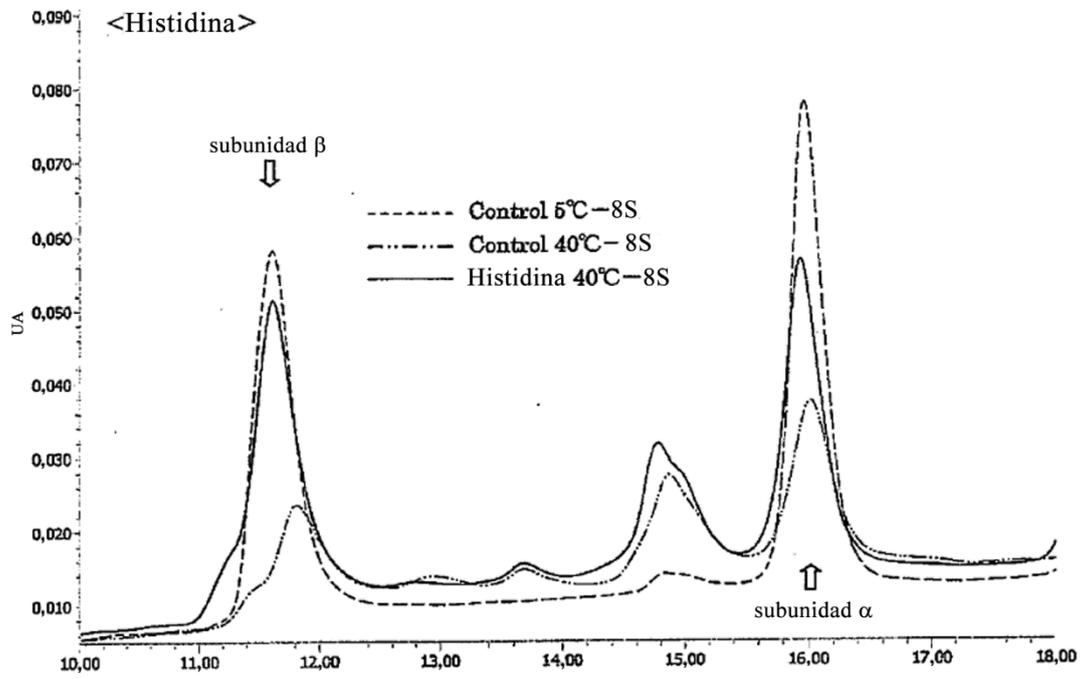
Aplicabilidad industrial

20 La composición acuosa de la presente invención es útil como una composición farmacéutica estable en la que se elimina la reducción de la actividad durante el almacenamiento y distribución.

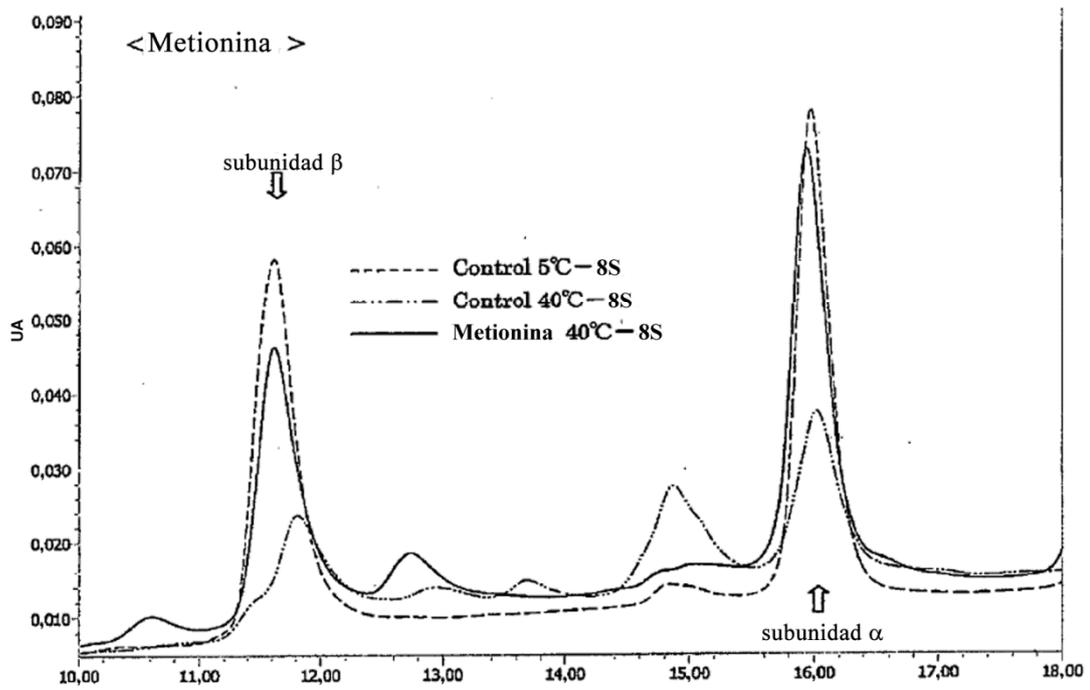
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición acuosa que comprende hormona foliculoestimulante e histidina y metionina como un agente estabilizante.
2. La composición acuosa según la reivindicación 1, en donde la concentración de histidina es de 0,05 a 10,0 mg/ml.
- 10 3. La composición acuosa según la reivindicación 1 o 2, que comprende una hormona foliculoestimulante humana recombinante genética como la hormona foliculoestimulante.
4. La composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además uno o dos o más tipos de sustancias seleccionadas del grupo que consiste en un sacárido, propilenglicol y creatinina.
- 15 5. La composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además uno o dos o más tipos de sustancias seleccionadas del grupo que consiste en xilitol, inositol, propilenglicol, sacarosa, gluconato de calcio, gluconato de sodio, manitol, macrogol 600 y creatinina.
- 20 6. La composición acuosa según la reivindicación 1, en donde la concentración de metionina es de 0,05 a 10 mg/ml.
7. La composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un tensioactivo.
- 25 8. La composición acuosa según la reivindicación 7, en donde el tensioactivo es un tensioactivo no iónico.
9. La composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además un agente tamponante fosfato o un agente tamponante citrato.
- 30 10. La composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que tiene un valor de pH de 6,5 a 8,0.
11. La composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además cloruro de sodio como un agente de tonicidad.
- 35 12. La composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además EDTA como un ácido policarboxílico.
- 40 13. Uso de un agente, que comprende histidina y metionina, para estabilizar una composición farmacéutica acuosa que contiene hormona foliculoestimulante como un principio activo.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]

