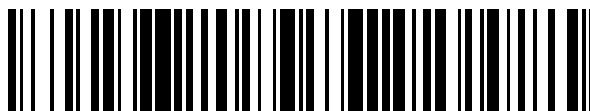


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 365**

51 Int. Cl.:

A61K 38/24 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2011 PCT/IN2011/000090**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11099036**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011 E 11741984 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2533800**

54 Título: **Formulación líquida de hormona estimulante del folículo**

30 Prioridad:

12.02.2010 IN MU03842010

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

19.12.2016

73 Titular/es:

**INTAS PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
2nd Floor Chinubhai Centre, Ashram Road
Ahmedabad, Gujarat 380009, IN**

72 Inventor/es:

**MAJUMDER, SUDIP KUMAR;
SHARMA, MANISH KUMAR y
GUPTA, TARUN KUMAR**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 594 365 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 hormona estimulante del folículo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una formulación acuosa novedosa de hormona estimulante del folículo (FSH) humana que es estable durante un periodo prolongado de tiempo a temperatura ambiente o corporal para garantizar una estabilidad en almacén razonable. Más específicamente, se refiere a una formulación acuosa de hormona estimulante del folículo humana que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de FSH humana estabilizada en un tampón que contiene uno o más de estabilizador, un tensioactivo no iónico, un antioxidante, sal inorgánica, y uno o más conservantes como se define en las reivindicaciones.

15 Antecedentes de la invención

Una hormona estimulante del folículo (FSH) humana es una hormona que desempeña una función importante en las funciones reproductivas, conjuntamente con la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG). Estructuralmente, la FSH es una glucoproteína heterodimérica formada por la asociación no covalente de subunidades alfa y beta. La subunidad alfa consiste en 92 restos de aminoácidos, mientras que la subunidad beta consiste en 111 restos de aminoácidos, cada uno de los cuales retiene dos sitios de glucosilación enlazados en Asn.

Hasta los años 80, la fuente primaria de FSH era la orina de mujeres embarazadas. Una forma purificada adicional de la FSH derivada de la orina se introdujo en los años 90, y después se desarrolló una FSH recombinante y se usó ampliamente desde 1998. Con la aparición de la tecnología de ADN recombinante, llegó a ser posible producir FSH humana en cultivos celulares transfectados con las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la cadena alfa y beta. Se han desvelado secuencias de ADN que codifican las cadenas alfa y beta, y métodos de producción de FSH recombinante en los documentos WO88/10270, WO86/04589 y EP0735139. La FSH estimula el crecimiento y la maduración de los folículos del ovario en las hembras. Por tanto, la FSH es una hormona crítica responsable de la ovulación de las hembras y se usa en el tratamiento de infertilidad de mujeres infértiles anovulatorias.

Actualmente, en el mercado, hay cuatro productos de FSH humana recombinante comerciales; Gonal - F[®] y Gonal-F RFF[®] de Merck Serono, y Puregon[®] y Follistim AQ[®] de Organon (Schering Plough), que se producen en células de ovario de hámster chino (CHO) por tecnología de ADN recombinante.

Generalmente, las proteínas tienen una semivida muy corta, y se someten a desnaturalización (tal como agregación, disociación y adsorción sobre la superficie de vasos) tras la exposición a diversos factores tales como temperaturas desfavorables, interfase agua-aire, alta presión, estrés físico/mecánico, disolventes orgánicos y contaminación microbiana. Por consiguiente, la proteína desnaturalizada pierde propiedades fisicoquímicas intrínsecas y actividad fisiológica. La desnaturalización de proteínas es frecuentemente irreversible y, por tanto, las proteínas, una vez desnaturalizadas, pueden no recuperar sus propiedades nativas al estado inicial.

En particular, las proteínas, que tienen una estructura heterodimérica que consiste en dos subunidades diferentes tales como FSH, tienen una tendencia a disociarse en soluciones acuosas y a adsorberse sobre la superficie interna de los vasos. Las proteínas disociadas pierden su propia actividad fisiológica, y los monómeros disociados son fácilmente susceptibles a disociación y agregación. Además, las proteínas adsorbidas sobre la superficie interna de los vasos son vulnerables a la agregación mediante el proceso de desnaturalización. Cuando se administran dentro del cuerpo humano, las proteínas agregadas pueden servir a la causa de formación de anticuerpos contra una proteína inyectada y también la proteína que existe de forma natural en el cuerpo humano. Por tanto, las proteínas de interés deben administrarse en un estado suficientemente estable. Para este fin, se ha hecho una gran investigación sobre el desarrollo de un método para prevenir la desnaturalización de proteínas en solución.

Para vencer los problemas de estabilidad de las proteínas, algunos de los medicamentos basados en proteína se hacen más estable mediante liofilización (secado por congelación). Como un ejemplo, el documento US5270057 desvela una formulación liofilizada que comprende gonadotropina estabilizada con ácido policarboxílico o una sal del mismo, preferentemente ácido cítrico y un disacárido no reductor, sacarosa. El documento US5650390 desvela una formulación liofilizada que comprende FSH, LH o hCG estabilizada por medio de una combinación de sacarosa y glicina. Sin embargo, los productos liofilizados son inapropiados, porque tienen que disolverse en agua para inyección (WFI) para la reconstitución antes de su uso. Además, el proceso de producción de los productos liofilizados implica una etapa de liofilización que podría producir daño por congelación a la proteína liofilizada.

El documento US5929028 desvela una formulación líquida estable de gonadotropina, que se prepara disolviendo gonadotropina [por ejemplo, LH, TSH (hormona estimulante tiroidea), FSH y hCG], usando un diluyente compuesto de una cantidad estabilizante de ácido policarboxílico o una sal del mismo, una cantidad estabilizante de un compuesto de tioéter, un disacárido no reductor como sacarosa y un tensioactivo no iónico. Según esta técnica, el citrato de sodio se describe como la forma más preferida del ácido policarboxílico o una sal del mismo y la formulación contiene 1,47 % de citrato de sodio. Esta composición debe almacenarse refrigerada a 2-8 °C hasta que

se dispense. Tras ser dispensado, el producto puede ser almacenado por el paciente a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad, o a o por debajo de 25 °C (77 °F) durante tres meses, cualquiera que se produzca primero.

5 La solicitud EP1610822 describe las formulaciones farmacéuticas de FSH, LH y mezclas de FSH y LH, y métodos de producción de tales formulaciones. La invención describe una formulación líquida o liofilizada de FSH o LH o FSH y LH que comprende un tensioactivo seleccionado de Pluronic®F77, Pluronic®F87, Pluronic®F88 y Pluronic®F68. La composición, como se describe en la presente solicitud de patente, requiere refrigeración a 2-8 °C hasta que se dispense. Tras la reconstitución con el diluyente, el dispositivo de pluma que contiene el medicamento puede ser almacenado por el paciente a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad o a temperatura ambiente 20-25 °C hasta tres meses o hasta la fecha de caducidad, cualquiera que se produzca primero.

15 El documento WO2007/037607 desvela una formulación acuosa de FSH que se estabiliza para mantener la actividad de FSH durante un periodo prolongado de tiempo. La solicitud de patente reivindica una formulación acuosa que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de FSH estabilizada en un tampón fosfato que contiene glicina, metionina y un tensioactivo no iónico, preferentemente polisorbato 20, que es capaz de mantener la actividad de FSH durante un periodo de tiempo prolongado. La composición contiene glicina, metionina, polisorbato 20 como estabilizador y 90 % de FSH pura que es estable a temperatura ambiente hasta seis meses y que se somete a menos oxidación.

20 La solicitud WO2009/098318 desvela una composición farmacéutica líquida que comprende un polipéptido de FSH y cloruro de benzalconio y alcohol bencílico como conservantes. La composición comprende además opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. En una realización, la composición contiene metionina como antioxidante. La composición muestra buena estabilidad durante el almacenamiento cuando se almacena a 2-8 °C. Esta formulación acuosa de FSH que comprende polisorbato 20 como tensioactivo, manitol como modificador de la tonicidad, fosfato como tampón, metionina como agente estabilizante y alcohol bencílico y cloruro de benzalconio como conservantes previene la pérdida de proteína, además de la disociación de la proteína en los monómeros constituyentes, estabilizando así la FSH durante un periodo prolongado de tiempo.

30 Puede observarse de las técnicas anteriores que la composición de FSH tiene que almacenarse refrigerada a 2-8 °C hasta que se dispense. Tras ser dispensado, el producto puede ser almacenado por el paciente a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad o por debajo de 25 °C (77 °F) durante tres meses, cualquiera que se produzca primero. Por tanto, existe la necesidad del desarrollo de una formulación acuosa termostable novedosa de FSH que se estabilice para mantener su actividad incluso a temperaturas elevadas (por ejemplo, temperatura corporal), ya que la FSH se auto-administra y, por tanto, sería conveniente llevarla cuando se viaja o durante el almacenamiento, obviando la necesidad de mantener el producto en condiciones refrigeradas (2-8 °C).

40 La presente invención se ha hecho en vista de los problemas a los que se enfrenta el usuario final que puede necesitar llevar el producto en una forma líquida a la temperatura de la habitación, temperatura ambiente o a la temperatura corporal sin la necesidad de refrigeración durante un periodo prolongado de tiempo para garantizar una estabilidad en almacén razonable.

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona una formulación acuosa novedosa de hormona estimulante del folículo (FSH) humana que es estable durante un periodo prolongado de tiempo a temperatura ambiente o corporal para así mantener una estabilidad en almacén razonable.

50 En un aspecto, la invención proporciona una formulación acuosa de FSH humana que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de FSH humana estabilizada en un sistema de tampón que contiene uno o más estabilizadores, un tensioactivo no iónico, un antioxidante, sal inorgánica, y uno o más conservantes como se define en las reivindicaciones.

55 En otro aspecto, la divulgación proporciona una formulación de FSH humana o su variante y una sal inorgánica seleccionada del grupo que consiste en cloruro sódico, cloruro de calcio y cloruro de potasio que actúa de agente termoestable.

En otro aspecto más de la divulgación, la formulación contiene un poliol que es sacarosa, trehalosa, maltosa, manitol, sorbitol, maltitol o xilitol, tanto solos como en combinación de los mismos.

60 La formulación de FSH humana de la divulgación también consiste en un tensioactivo no iónico basado en polisorbato o un tensioactivo no iónico basado en poloxámero o una combinación de los mismos.

65 En un aspecto de la divulgación, la novedosa formulación acuosa de FSH humana también contiene antioxidante seleccionado del grupo que consiste en L-metionina, bisulfito de sodio, sales de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxilanisol butilado (BAH).

La divulgación también proporciona la adición de uno o más conservantes a la formulación de FSH humana seleccionados del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alquilparabeno, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o una combinación de los mismos.

5 La novedosa formulación acuosa de FSH humana de la divulgación se mantiene a un pH de aproximadamente 6,5 a 7,2 en un sistema de tampón seleccionado del grupo tampones que consiste en fosfato, succinato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina, o una combinación de los mismos.

10 La presente invención proporciona una formulación de FSH humana que comprende cloruro sódico, trehalosa, manitol, polisorbato 20, L-metionina, fenol, fosfato de sodio monobásico monohidratado y fosfato de sodio dibásico dihidratado y mantenida a un pH de aproximadamente 6,5 a 7,2.

15 La presente invención también proporciona una formulación de FSH humana que comprende sacarosa, L-metionina, polisorbato 20, fenol, fosfato de sodio monobásico monohidratado y fosfato de sodio dibásico deshidratado y mantenida a un pH de aproximadamente 6,5 a 7,2.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra la comparación de la disociación de las subunidades alfa y beta de la composición de hormona estimulante del foliculo humana recombinante mantenida a 40 °C durante 7 días

25 Carril 1: Marcador pre-teñido
 Carril 2: Tampón de muestra
 Carril 3: Composición dada en la Tabla 1 (proteína cargada 4,4 ug)
 Carril 4: Especialidad farmacéutica de referencia (pluma Gonal F RFF) (proteína cargada 4,4 ug)
 Carril 5: 0,22 µg disociados (hirviendo) de FSH (5,0 % de 4,4 µg)
 Carril 6: 0,11 µg de FSH intacta (2,5 % de 4,4 µg)
 Carril 7: Tampón de muestra

30 La Figura 2 muestra la comparación de la disociación de las subunidades alfa y beta de la composición de hormona estimulante del foliculo humana recombinante mantenida a 2-8 °C durante 3 meses

35 Carril 1: Marcador pre-teñido
 Carril 2: Composición dada en la Tabla 1 (proteína cargada 2,2 µg)
 Carril 3: 0,44 µg disociados (hirviendo) de FSH (10,0 % de 4,4 µg)
 Carril 4: 0,22 µg disociados (hirviendo) de FSH (5,0 % de 4,4 µg)
 Carril 5: 0,11 µg disociados (hirviendo) de FSH (2,5 % de 4,4 µg)
 Carril 6: 0,04 µg disociados (hirviendo) de FSH (1,0 % de 4,4 µg)
 Carril 7: 0,02 µg de FSH intacta (0,5 % de 4,4 µg)
 Carril 8: 0,04 µg de FSH intacta (1,0 % de 4,4 µg)
 Carril 9: Composición dada en la Tabla 1 (proteína cargada 4,4 µg)
 Carril 10: Composición dada en la Tabla 1 (proteína cargada 4,4 µg)
 Carril 11: Composición dada en la Tabla 1 (proteína cargada 4,4 µg)

45 La Figura 3 muestra la comparación de la disociación de las subunidades alfa y beta de la composición de hormona estimulante del foliculo humana recombinante mantenida a 25 °C durante 3 meses

50 Carril 1: Marcador pre-teñido
 Carril 2: Composición dada en la Tabla 1 (proteína cargada 2,2 µg)
 Carril 3: 0,44 µg disociados (hirviendo) de FSH (10,0 % de 4,4 µg)
 Carril 4: 0,22 µg disociados (hirviendo) de FSH (5,0 % de 4,4 µg)
 Carril 5: 0,11 µg disociados (hirviendo) de FSH (2,5 % de 4,4 µg)
 Carril 6: 0,04 µg disociados (hirviendo) de FSH (1,0 % de 4,4 µg)
 Carril 7: 0,04 µg de FSH intacta (1,0 % de 4,4 µg)
 Carril 8: 0,02 µg de FSH intacta (0,5 % de 4,4 µg)
 Carril 9: Composición dada en la Tabla 1 (proteína cargada 4,4 µg)
 Carril 10: Composición dada en la Tabla 1 (proteína cargada 4,4 µg)
 Carril 11: Composición dada en la Tabla 1 (proteína cargada 4,4 µg)

60 La Figura 4 muestra el perfil de RP-HPLC comparativo de la composición dada en la Tabla 1 con la especialidad farmacéutica de referencia

La Figura 5 muestra el perfil de SE-HPLC comparativo de la composición dada en la Tabla 1 (línea roja) con la especialidad farmacéutica de referencia (línea azul)

65

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una novedosa formulación acuosa de FSH que se estabiliza para mantener su actividad a temperatura elevada con una disociación inferior al 5 % después de dos horas a 55 °C.

5 En una realización, la formulación acuosa de la presente invención comprende hormona estimulante del folículo humana recombinante junto con tampones, antioxidantes, tensioactivos no iónicos adecuados, uno o más estabilizantes, sales inorgánicas y opcionalmente uno o más conservantes.

10 La hormona estimulante del folículo (FSH) humana se produce por la tecnología de ADN recombinante. Siendo la FSH una proteína heterodimérica compleja, se ha seleccionado una línea celular eucariota para el trabajo de expresión (células de ovario de hámster chino). La preparación farmacéutica de FSH humana recombinante (rFSH) se diferencia de la de gonadotropina menopáusica humana (hMG) y la primera generación de FSH urinaria (uFSH) en términos de la fuente de proteína a granel, pureza, actividad específica, conformidad lote a lote y ausencia
15 completa de actividad de hormona luteinizante.

Se usan tampones para mantener el pH de la formulación. En otra realización de la divulgación, el sistema de tampón que se usa en la presente formulación comprende tampón fosfato, tampón succinato, tampón acetato, tampón citrato, arginina, tampón Tris, histidina tanto sola como en combinación adecuada que da el intervalo de pH deseado de 6,5 a 8. Preferentemente, el tampón usado es tampón fosfato tanto solo como en combinación.

20

Antioxidante, como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia química que reduce la cantidad de impureza/especie de FSH oxidada dentro de una solución que contiene FSH. El antioxidante usado en la presente divulgación está seleccionado del grupo que consiste en L-metionina, bisulfito de sodio, sales de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxilanol butilado (BAH). Más preferentemente el antioxidante es L-metionina. El tensioactivo no iónico se usa en la presente invención con el fin de prevenir la adsorción de FSH o variante de FSH sobre la superficie del vial, ampolla, carpule, cartucho o jeringa.

25

Los tensioactivos no iónicos reducen la tensión superficial de una solución de proteínas, previniendo así la adsorción o agregación de proteínas sobre una superficie hidrófoba. Ejemplos preferidos del tensioactivo no iónico que se usa en la presente divulgación pueden incluir un tensioactivo no iónico basado en polisorbato y un tensioactivo no iónico basado en poloxámero, tanto solo como en combinación.

30

Los estabilizantes usados en la presente divulgación se seleccionan del grupo que consiste en aminoácidos tales como glicina y alanina, tanto solos como en combinación de los mismos, monosacáridos tal como glucosa, fructosa, xilosa y manosa, tanto solos como en combinación, polioles tales como sacarosa, trehalosa, maltosa, manitol, sorbitol, maltitol y xilitol, tanto solos como en combinación de los mismos. La presencia de polioles protege a las moléculas durante el almacenamiento a temperatura relativamente alta.

35

Conservantes se refiere a excipientes o sustancias añadidas a una formulación para actuar de agente bacteriostático cuando se cargan como multidosis. Una formulación que contiene FSH o variante de FSH preservada de la presente invención cumple preferentemente las normas reglamentarias o legislativas para que la eficacia del conservante sea un producto de multi-dosis comercialmente viable, preferentemente en seres humanos. Los conservantes usados en la presente divulgación se seleccionan del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo, etc.), cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, tanto solos como en combinación de los mismos.

40
45

Sales inorgánicas de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, cloruro sódico, cloruro de calcio y cloruro de potasio. Estas sales actúan de agentes termoestables aumentando la temperatura de fusión del producto y también reducen la interacción no específica de la molécula, aumentando así la estabilidad del producto a mayores temperaturas. También previenen la disociación de la FSH intacta en subunidades alfa y beta.

50

Los siguientes ejemplos ilustran las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención y los medios de llevar a cabo la invención para obtener una formulación farmacéutica térmicamente estable de FSH humana. Estos ejemplos no deben, sin embargo, interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

55

Ejemplo 1

Producción de FSH humana recombinante por tecnología de ADN recombinante

60 Se produce FSH humana recombinante en células huésped CHO transfectadas por métodos convencionales.

Ejemplo 2

Preparación de formulación acuosa de hFSH con trehalosa y manitol

- 5 El tampón de formulación contiene dihidrogenofosfato de monosodio monohidratado y hidrogenofosfato de disodio deshidratado para preparar tampón fosfato de pH 7,0. Se añaden manitol, trehalosa y cloruro sódico al tampón fosfato como modificador de la tonicidad y estabilizador. Se añade L-metionina a la solución como antioxidante y polisorbato 20 como estabilizador para formar un tampón de formulación, el pH se ajusta con solución de ácido fosfórico o solución de hidróxido sódico para obtener el pH de $7,0 \pm 0,2$. Enrasar al 100 % con WFI y agitar la solución para homogeneidad. Se mezclan las cantidades requeridas de tampón de formulación y fenol para formar una mezcla homogénea. La cantidad calculada de principio activo de rHu-FSH se añade con agitación continua hasta la formación completa de mezcla homogénea.

Tabla 1: Formulación de hFSH

N.º de serie	Ingrediente	Concentración
1.	Folitropina (hFSH)	0,05 mg/ml
2.	Trehalosa	30 mg/ml
3.	Manitol	30 mg/ml
4.	Cloruro sódico	5,8 mg/ml
5.	Fosfato de sodio monobásico monohidratado	0,45 mg/ml
6.	Fosfato de sodio dibásico dihidratado	1,1 mg/ml
7.	L-Metionina	0,5 mg/ml
8.	Polisorbato 20	0,1 mg/ml
9.	Fenol	3 mg/ml
10.	Agua para inyección	

- 15 Ejemplo 3: Prueba de estabilidad de formulaciones acuosas de hFSH
- Las pruebas biológicas se han realizado en cumplimiento con las regulaciones de la Farmacopea Europea.
- 20 Concentración de proteína por SE-HPLC
- La formulación del Ejemplo 1 se evaluó para el contenido de proteína para FSH usando el método de HPLC por exclusión de tamaño.
- 25 Se midió el contenido de proteína en el tiempo cero y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento de la formulación a 5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C. Los resultados se tabulan en la Tabla 1 como microgramos de FSH por gramo de disolvente.
- 30 Análisis de HPLC de fase inversa para la oxidación
- La formulación acuosa del Ejemplo 1 se evaluó para el contenido de proteína para FSH usando un método de HPLC de fase inversa.
- 35 La pureza se midió a tiempo cero, y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento de la formulación a 5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C. Los resultados se tabulan en la Tabla 2.
- Disociación
- 40 Para una formulación como la dada en la Tabla 1, el porcentaje de subunidad libre evaluó por SDS-PAGE. Las mediciones se hicieron a tiempo cero, y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento a 5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C. Los resultados se informan en la Tabla 2.
- Ensayo *in vivo* para FSH
- 45 La formulación de la Tabla 1 se probó para la actividad de FSH usando el bioensayo *in vivo* a tiempo cero y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento a 5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C. Los resultados se proporcionan en la Tabla 2 como unidades internacionales por gramo de disolvente.

ES 2 594 365 T3

pH

El pH de la formulación de la Tabla 1 se midió a tiempo cero y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento a $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Los resultados se enumeran en la Tabla 2.

5

Determinación de oligómeros por SE-HPLC

El porcentaje de oligómero para la formulación de la Tabla 1 se midió a tiempo cero y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento a $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por SE-HPLC. Los resultados se proporcionan en la Tabla 2.

10

Tabla 2 – Parámetros analíticos para una formulación líquida de FSH a tiempo cero y después de almacenamiento a $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1, 2, 3 y 6 meses										
Ensayo	Tiempo cero		1 mes		2 meses		3 meses		6 meses	
	$5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$	$25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$	$5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$	$25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$	$25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$	$25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
Concentración de proteína por SE-HPLC ($\mu\text{g/ml}$)	44,75	44,75	44,47	44,70	No probado	No probado	No probado	No probado	No probado	No probado
Análisis de HPLC de fase inversa para la oxidación	1,42 %	1,42 %	1,49 %	1,75 %	1,60 %	1,88 %	1,67 %	2,23 %	1,81 %	2,7
Disociación	<1 %	<1 %	<1 %	<1 %	<1 %	<1 %	<1 %	<2,5 %	No probado	No probado
Ensayo <i>in vivo</i> para FSH (UI/mg)	12319	12319	No probado	No probado	No probado	No probado	No probado	No probado	No probado	147
Ensayo <i>in vitro</i> para FSH (UI/mg)	16169	16169	9179	13803	15406	9794	15616	13848	12340	131
pH	6,89	6,89	7,00	7,00	6,89	7,00	7,06	7,04	7,08	7,09
Determinación de oligómero (SE-HPLC)	0,06 %	0,06 %	0,07 %	0,06 %	0,13 %	0,16 %	0,15 %	0,17 %	0,15 %	0,2

Ejemplo 4: Prueba de estabilidad de formulaciones acuosas de hFSH

Concentración de proteína por SE-HPLC

15

La formulación como se proporciona en la Tabla 1 se evaluó para contenido de proteína para FSH usando el método de HPLC de exclusión por tamaño.

El contenido de proteína se midió a tiempo cero y después de 1, 3, 7 y 15 días de almacenamiento de la formulación a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Los resultados se tabulan en la Tabla 3 como microgramos de FSH por gramo de disolvente.

20

Análisis de HPLC de fase inversa para pureza

La formulación acuosa del Ejemplo 1 se evaluó para el contenido de proteína para FSH usando un método de HPLC de fase inversa.

25

La pureza se midió a tiempo cero y después de 1, 3, 7 y 15 días de almacenamiento de la formulación a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Los resultados se tabulan en la Tabla 3.

30

Oxidación

El porcentaje de forma oxidada de FSH se midió por un método de HPLC de fase inversa.

El porcentaje de forma oxidada de FSH se midió a tiempo cero y después de 1, 3, 7 y 15 días de almacenamiento de la formulación a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Los resultados se tabulan en la Tabla 3.

35

Disociación

Para la formulación de la Tabla 1, el porcentaje de subunidad libre se evaluó por SDS-PAGE. Las mediciones se hicieron a tiempo cero y después de 1, 3, 7 y 15 días de almacenamiento de la formulación a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Los resultados se proporcionan en la Tabla 3.

40

Ensayo *in vivo* para FSH

5 La formulación de la Tabla 1 se probó para la actividad de FSH usando el bioensayo *in vivo* a tiempo cero y después de 1, 3, 7 y 15 días de almacenamiento de la formulación a 40 °C. Los resultados se tabulan en la Tabla 2 como unidades internacionales por gramo de disolvente.

pH

10 El pH de la formulación del Ejemplo 1 se midió a tiempo cero y después de 1, 3, 7 y 15 días de almacenamiento de la formulación a 40 °C. Los resultados se tabulan en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados de las pruebas de estabilidad para la formulación de hFSH

Ensayo	Tiempo cero	1 día	3 días	7 días	15 días
	40 °C	40 °C	40 °C	40 °C	40 °C
Concentración de proteína por SE-HPLC (µg/ml)	44,75	44,15	42,48	42,45	41,67
Análisis de HPLC de fase inversa para la pureza Oxidación	1,42 %	1,57 %	1,6 %	1,74 %	2,11 %
Disociación	<1 %	<2,5 %	= 2,5 %	<5 %	No probado
Ensayo <i>in vivo</i> para FSH	12319	No probado	No probado	12055	No probado
Ensayo <i>in vitro</i> para FSH	16169	9872	11163	10110	9402
pH	6,89	7,00	6,99	6,99	6,99
Determinación de oligómeros (SE-HPLC)	0,06 %	0,08 %	0,09 %	0,16 %	0,18 %

15 Como es evidente de los resultados anteriores, una formulación acuosa de la presente invención (como se proporciona en la Tabla 1) que comprende trehalosa y manitol como estabilizador, polisorbato como tensioactivo, metionina como agente antioxidante y fenol como conservante mantenida a un pH de aproximadamente 6,7 y 7,2 usando fosfato como tampones según la invención previene la disociación, oxidación, desnaturalización y puede mantener establemente la actividad de una rHu-FSH durante un periodo prolongado de tiempo.

20 La formulación preparada por dicha invención comprende una cantidad eficaz de hormona estimulante del folículo humana biológicamente activa que puede usarse en el tratamiento de infertilidad en seres humanos. Se usan preferentemente como soluciones acuosas inyectables.

25 Una nueva formulación acuosa termoestable de la hormona estimulante del folículo humana descrita en la presente invención tiene las siguientes ventajas:

1. Implica simplicidad operacional.
2. Implica el uso de sales inorgánicas que previenen la disociación de las subunidades alfa y beta de la hormona estimulante del folículo humana.
3. Proporciona mejor estabilidad a la formulación acuosa para mantener su actividad durante un periodo prolongado de tiempo para garantizar una estabilidad en almacén razonable.
- 35 4. Proporciona mejor estabilidad a la formulación acuosa a temperaturas elevadas.

REIVINDICACIONES

5 1. Una formulación acuosa de la hormona estimulante del folículo (FSH) humana que comprende cloruro sódico como agente termoestable, trehalosa y manitol como estabilizantes, polisorbato 20 como tensioactivo no iónico, L-metionina como antioxidante, fenol como conservante y un tampón fosfato que proporciona un pH de aproximadamente 6,5 a 7,2.

10 2. La formulación de la reivindicación 1, que comprende FSH humana en una concentración de 0,05 mg/ml, cloruro sódico en una concentración de 5,8 mg/ml, trehalosa en una concentración de 30 mg/ml, manitol en una concentración de 30 mg/ml, L-metionina en una concentración de 0,5 mg/ml, polisorbato 20 en una concentración de 0,1 mg/ml, fenol en una concentración de 3 mg/ml y un tampón fosfato en una concentración de 1,55 mg/ml que proporciona un pH de $7,0 \pm 0,2$.

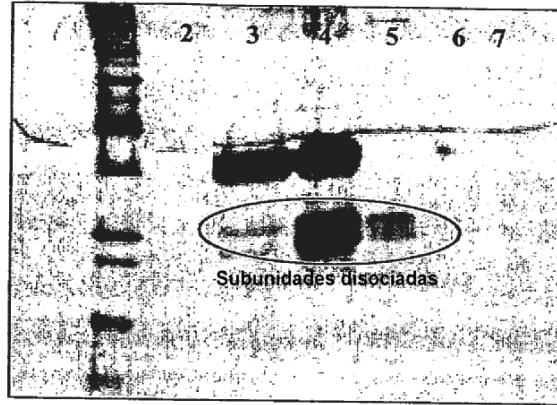


Figura 1

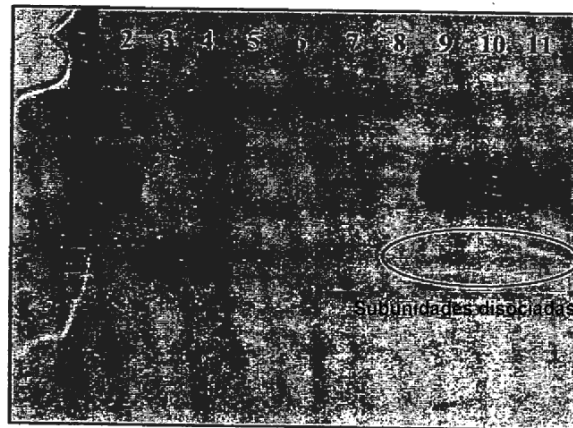


Figura 2

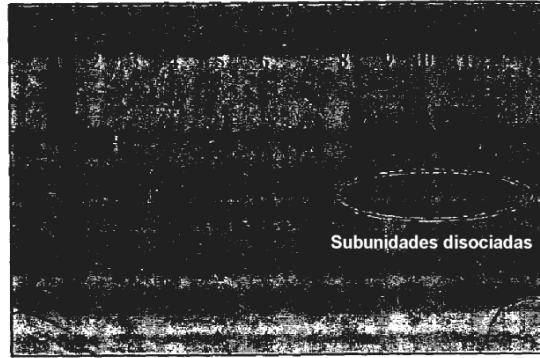


Figura 3

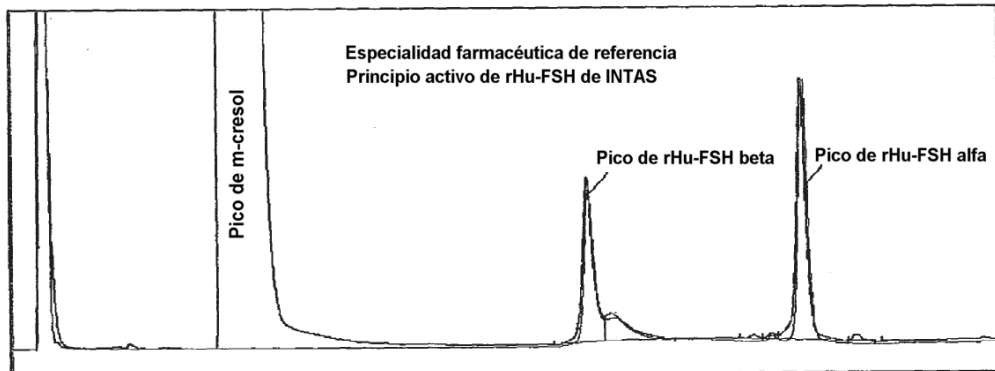


Figura 4

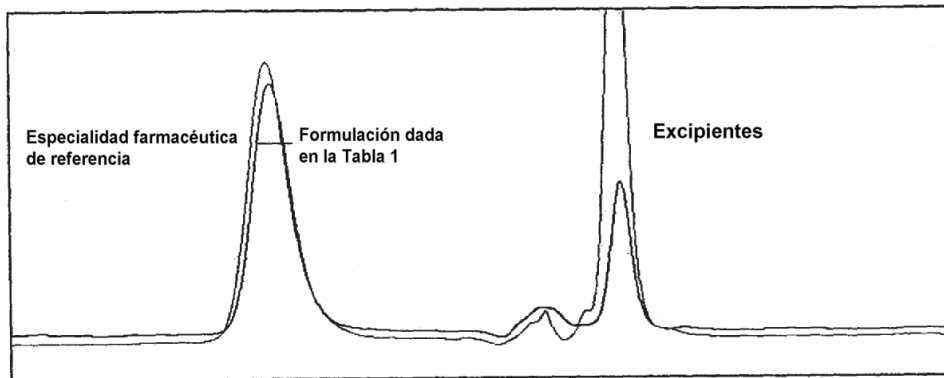


Figura 5