

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 634**

51 Int. Cl.:

A61K 38/24	(2006.01)
C07K 14/59	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01)
A61K 47/02	(2006.01)
A61K 47/12	(2006.01)
A61K 47/10	(2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2011 PCT/EP2011/062986**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12013742**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2011 E 11736111 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2598160**

54 Título: **Estabilización de FSH**

30 Prioridad:

30.07.2010 EP 10171428

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2017

73 Titular/es:

**FERRING BV (100.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL**

72 Inventor/es:

**SJÖGREN, HELEN ULRIKA y
BAGGER, HEIDI LOUISE**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 623 634 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

Estabilización de FSH

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención pertenece en general al campo de estabilización de formulaciones de FSH, en particular, formulaciones líquidas de FSH. La estabilización se logra mediante la adición de Na₂SO₄ o una combinación de NaCl y Na₂SO₄.

ANTECEDENTES

10 Las gonadotropinas son una familia de hormonas, las cuales fundamentalmente están principalmente involucradas en el ciclo de fertilidad en mujeres y hombres. Las gonadotropinas se pueden derivar de la orina, tanto para fines de investigación como de tratamiento, sin embargo varias gonadotropinas se pueden producir de forma recombinante.

En particular, las gonadotropinas se pueden emplear en el tratamiento de infertilidad.

15 Las cuatro principales gonadotropinas que están involucradas aquí y que todas pertenecen a la misma familia de glicoproteínas son la hormona folículo estimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica (hCG). Todas estas gonadotropinas consisten de una subunidad alfa y una beta; la subunidad alfa es común a todas, es decir, la misma para todas las cuatro gonadotropinas antes mencionadas, mientras que la subunidad beta difiere, respectivamente.

Como mencionado anteriormente, las gonadotropinas son un grupo de hormonas de glicoproteína heterodiméricas que regulan la función gonadal en el macho y la hembra. Estas incluyen la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica (humana) (hCG).

20 FSH es secretada de forma natural por la glándula pituitaria anterior y sirve para apoyar el desarrollo folicular y la ovulación. FSH comprende una subunidad alfa de 92 aminoácidos, también común a las otras hormonas de glicoproteínas, por ejemplo LH y hCG, y una unidad beta de 111 aminoácidos singular para FSH que confiere la especificidad biológica de la hormona (*Pierce and Parsons, 1981, Glycoprotein hormones: structure and function, Ann Rev Biochem., 50: 465-495*). Cada subunidad se modifica post-translacionalmente mediante la adición de residuos carbohidrato complejos. Ambas subunidades tienen dos sitios para la unión de glicano N-enlazado, la subunidad alfa en los aminoácidos 52 y 78 y la subunidad beta en los residuos de aminoácido 7 y 24 (*Rathnam and Saxena, (1975) Primary amino acid sequence of follicle stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit, J Biol Chem. 250 (17):6735-6746 Saxena and Rathnam, (1976) Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands, J Biol Chem. 251(4): 993-1005*). Por lo tanto FSH es glicosilada en aproximadamente el 30% en masa (*Dias and Van Roey, (2001) Structural biology of human follitropin and its receptor. Arch Med Res. 32(6): 510-519; Fox et al. (2001) Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. Mol Endocrinol. 15(3), 379-89*).

35 FSH purificada a partir de orina humana posmenopáusica se ha utilizado durante muchos años en el tratamiento de infertilidad; tanto para promover la ovulación en reproducción natural como para proporcionar ovocitos para tecnologías de reproducción asistida. Dos versiones recombinantes de FSH, Gonal-f (Merck Serono) y Puregon (Schering-Plough) se hicieron disponibles a mediados de la década de los 1990. Estas se expresan ambas en células de ovario de hámster chino (CHO) (*Howles, C.M. (1996), genetic engineering of human FSH (Gonal-f), Hum Reprod. Update, 2: 172-191*). La CG con frecuencia se utiliza en tratamientos de infertilidad debido a que este compuesto tiene un actividad LH.

40 Tanto la FSH humana como la hCG son heterodímeros compuestos de una subunidad alfa y una subunidad beta. La subunidad alfa en ambas hormonas es idéntica. Diferencias entre las dos hormonas son conferidas por la subunidad beta. La subunidad beta madura de FSH se compone de 111 aminoácidos, mientras que la de hCG se compone de 145 aminoácidos, adicionalmente la secuencia primaria de aminoácidos de la subunidad beta de FSH y hCG difieren en toda la cadena beta. La cadena beta de ambas FSH y hCG contiene seis puentes disulfuro, debido a su diferente secuencia aminoacídica sin embargo difieren en su estructura de orden superior, resultando en un plegamiento y una distribución de regiones cargadas, polares e hidrófobas, diferentes. (*Fox et al. (2001) Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. Mol Endocrinol. 15(3), 379-89*).

45 A pesar de que ambas subunidades beta de FSH y hCG están glicosiladas, la subunidad beta de FSH contiene solamente N-glicosilación (N-7 y N-24) mientras que la subunidad beta de hCG contiene tanto N- como O-glicosilación (N-13, N-30, O -121, O-127, O-132 y O-138). La glicosilación adicional en la subunidad beta de hCG hace que sea más hidrófila que la de FSH. Subunidades β proporcionan especificidad para la interacción con el receptor.

Comúnmente se usan células CHO para la producción de proteínas recombinantes farmacéuticas. Análisis estructural ha identificado que el ácido siálico está unido exclusivamente mediante una vinculación α2,3. Muchas glicoproteínas

humanas contienen una mezcla tanto de vinculaciones $\alpha 2,3$ como $\alpha 2,6$ para residuos de ácido siálico. Por lo tanto, proteínas recombinantes expresadas utilizando el sistema CHO diferirán de sus homólogos naturales en su tipo de vínculos terminales de ácido siálico.

INFERTILIDAD

5 En el presente contexto, "infertilidad" se define como la capacidad reducida o la incapacidad para concebir y tener descendencia. Mujeres que son capaces de quedar embarazadas pero después tienen abortos espontáneos repetidos también se dice que son infértiles. La infertilidad se define también en términos específicos como la incapacidad de concebir después de un año de coitos regulares sin contracepción.

10 La infertilidad puede deberse a muchas causas. Estudios han demostrado que poco más de la mitad de casos de infertilidad son el resultado de condiciones femeninas.

El resto son causados por trastornos de esperma y por factores inexplicados.

Actualmente existen diversas posibilidades para el tratamiento de la infertilidad.

Esos son un coito programado, el uso de tecnologías de reproducción asistida (TRA), un tratamiento médico de endometriosis, fibromas y disfunción sexual femenina (DSF), y cirugía para corregir anomalías.

15 En tecnologías de reproducción asistida, se utilizan fármacos para estimular la ovulación. Además de LH y hCG, FSH es uno de aquellos compuestos que se utilizan en este contexto.

Para la administración, son adecuadas formulaciones líquidas de estos compuestos.

20 Desafortunadamente, se ha mostrado en el pasado que los conservantes añadidos a formulaciones líquidas, en particular alcohol bencílico (BA), fenol y m-cresol, ejercen un efecto desestabilizante sobre la proteína (Maa, Y.F. and Chung, C.H. 1996, *Aggregation of recombinant human growth hormone induced by phenolic compounds. Int. J. Pharm. 140:155-168* ; Lam, X.M., Patapoff, T.W., and Nguyen, T.H. 1997, *The effect of benzyl alcohol on recombinant human interferon-gamma. Pharm. Res. 14:725-729* ; Hoffmann, J.A. and Lu, J. 2002, *FSH and FSH variant formulations comprising benzyl alcohol as a preservative. EP0974359B1*, 1-50).

25 Por lo tanto es importante proporcionar una formulación estabilizada, en particular en vista del hecho de que la dosificación de la FSH a ser administrada debería reducir el riesgo de efectos secundarios de formas disociadas o agregadas tales como respuestas inmunogénicas, si está presente FSH no nativa.

Los acontecimientos desestabilizantes que resultan de conservantes sin embargo disminuyen el nivel real de gonadotropina activa, es decir FSH, en una formulación líquida.

30 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar formulaciones, en particular formulaciones líquidas de FSH, que son estables, así como un método para su estabilización.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 para la estabilización de una formulación líquida de FSH a fin de estabilizar una formulación líquida de FSH. La formulación líquida a ser estabilizada puede ser una formulación con o sin conservante.

35 La formulación a la que se le ha suministrado la sal estabilizante es por lo tanto una realización alternativa almacenada en un estado liofilizado. Liofilización se lleva a cabo tal y como es conocido en general para una persona experta en la materia. La formulación liofilizada se puede entonces almacenar hasta su uso final con el paciente. Antes de la administración, la formulación liofilizada se reconstituye entonces con un medio de reconstitución conocido cualquiera, por ejemplo agua esterilizada. La sal está comprendida bien en la formulación liofilizada o bien en el líquido de reconstitución.

40 20. Uso o método de cualquiera de los elementos anteriores donde la formulación líquida es una formulación de uso único o una formulación multidosis, preferiblemente para inyección.

En una realización preferida, la sal está comprendida en la formulación líquida per se la cual no se liofiliza sino se conserva en almacenamiento como un líquido.

45 La presente invención se refiere a la estabilización de una formulación líquida de FSH donde la sal es Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 .

Como descrito anteriormente, las formulaciones líquidas de FSH son adecuadas para el tratamiento de infertilidad. En este sentido, ha quedado claro que las formulaciones líquidas de FSH pueden ser inestables; esto es cierto para todas las formulaciones líquidas de FSH incluidas aquellas destinadas a un único uso. La inestabilidad puede ser aún más pronunciada si las formulaciones líquidas de FSH comprenden un conservante, el cual es necesario por ejemplo para todas las formulaciones multidosis. Este conservante puede ser cualquier conservante útil para conservar una formulación de FSH; por lo tanto, el conservante puede ser un conservante como aprobado por la FDA para formulaciones de FSH, en particular por ejemplo un conservante aprobado por la FDA, aprobado para formulaciones parenterales de FSH, como por ejemplo alcohol bencílico, fenol y/o m-cresol; el conservante sin embargo no está de ninguna manera limitado a esos ejemplos. La estabilidad de FSH se reduce por ejemplo mediante alcohol bencílico, fenol y/o m-cresol.

Por consiguiente, las sales Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 aquí reivindicadas y descritas, se utilizan para la estabilización de formulaciones de FSH de un único uso.

Además, las sales aquí reivindicadas y descritas, Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 , se utilizan para la estabilización de formulaciones multidosis de FSH; tales formulaciones no necesitan comprender un conservante pero pueden también comprender un conservante.

La adición de las sales aquí reivindicadas comprenden Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 , estabiliza una formulación líquida de FSH. La estabilización se logra en formulaciones de un único uso o multidosis, en particular durante un período de almacenamiento más prolongado y puede ser ventajosa, en una realización adicional posible, como una contramedida para el efecto desestabilizante de conservantes, como alcohol bencílico, fenol y/o m-cresol.

Las sales, las cuales se utilizan según la presente invención, son Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 .

La sal preferiblemente está comprendida en una cantidad de 20 a 500 mM, aún más preferiblemente está comprendida en una cantidad de 30-300 mM; en una realización particularmente preferida, está comprendida en una cantidad de 50-200 mM.

La cantidad máxima de sal añadida se limita a la osmolalidad de la solución. Para minimizar el dolor después de la inyección, la solución preferiblemente debe ser isotónica o al menos no hipertónica. Dado que todos los excipientes en la solución contribuyen a la osmolalidad, la cantidad máxima de sal que se podría añadir a una solución es dependiente de la cantidad de otros componentes presentes.

La sal preferiblemente está comprendida en una cantidad que resulta en una osmolalidad máxima de 350 mosmol/kg, incluso más preferiblemente en una cantidad que resulta en una osmolalidad máxima de 320 mosmol/kg; en una realización particularmente preferida, está comprendida en una cantidad que resulta en una osmolalidad máxima de 300 mosmol/kg.

Teoría de la Osmolalidad

La osmolalidad es un medio práctico de proporcionar una medida global de la contribución de los diversos solutos presentes en una solución a la presión osmótica de la solución. La osmolalidad se puede medir de acuerdo con la Farmacopea Europea, *Ph. Eur. 2.2.35, 7th edition, supplement 2011 (7.2), Osmolality, 01/2008:20235*.

Una "sal" en el contexto de la presente invención es Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 .

Los inventores han encontrado de manera sorprendente que Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 son particularmente adecuados para la estabilización de una formulación de FSH.

La gonadotropina que se puede estabilizar de acuerdo con la presente invención es FSH, es decir hormona folículo estimulante, opcional en combinación con ingredientes activos adicionales.

La FSH es derivada de orina o plasma o FSH recombinante (rFSH). En una realización preferida, la FSH es derivada de orina o rFSH; particularmente preferida es rFSH.

Como mencionado anteriormente, ahora es posible producir FSH de manera recombinante. Por lo tanto, la referencia aquí a una FSH en general siempre incluye tanto la derivada de orina como también la gonadotropina recombinante (r). Por lo tanto, la referencia a FSH también incluye rFSH.

La formulación de acuerdo con la presente invención es una formulación líquida de rFSH, más preferiblemente inyectable, la cual se estabiliza mediante Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 .

En una realización alternativa, la rFSH de todas las realizaciones es una FSH de acción prolongada. Las formulaciones de FSH de acción prolongada se pueden obtener como es en general conocido por una persona experta en la materia, por ejemplo modificando la molécula de FSH o modificando la formulación.

La FSH aquí por lo tanto incluye todas las formas posibles derivadas de orina o recombinantes de la FSH anteriormente mencionada así como todas las combinaciones posibles de formas de FSH. También se incluye una formulación para uso único y una o más formulaciones adicionales (de la misma gonadotropina o una diferente) para uso multidosis.

5 Un posible producto puede ser una formulación que incluye FSH (opcionalmente con CG, LH, actividad LH etc.), todos en diferentes viales. La actividad LH, si está presente, puede proceder de LH o CG. LH se puede sustituir por una dosis equivalente de CG y viceversa; una "dosis equivalente" en ese contexto se puede calcular sobre la base de que 1UI de CG es equivalente a 5 - 7UI de LH en la Farmacopea *Pharmacopeia Van Hell Bioassay (Van Hell, H et al, Acta Endocrin. 47, 409-418, 1964)*.

Una combinación preferida es la de (r)FSH, (r)LH y (r)hCG, todas en diferentes viales.

10 Posibles combinaciones en diferentes viales también incluyen: (u)FSH derivada de orina y uhCG o uFSH y uLH; además (rhCG o rLH o rFSH) y (uhCG o uLH o rhCG or rLH), y todas las permutaciones posibles de las mismas.

Otra combinación preferida es la de (r)FSH y (r)hCG, en diferentes viales, respectivamente.

Otra combinación preferida es la de (r)FSH y (r)LH, en diferentes viales, respectivamente.

La formulación de FSH de la presente invención es una formulación líquida.

15 Preferiblemente, la formulación es inyectable. Las formulaciones se pueden suministrar como un producto que tiene una, dos o más composición(es) farmacéutica(s) que incluyen FSH o FSH/hCG, para la administración por separado o en conjunto. Si se administran por separado, la administración puede ser secuencial. El producto se puede suministrar en cualquier envase apropiado. Por ejemplo, un producto puede contener un número de jeringas precargadas, incluyendo cada una FSH (una composición de FSH), o adicionalmente hCG (una composición de hCG), por ejemplo
20 donde las jeringas se pueden envasar en un envase de blíster u otros medios para mantener la esterilidad. Un producto puede opcionalmente contener instrucciones para utilizar las formulaciones de FSH.

De acuerdo con un aspecto adicional, la formulación de FSH inventiva se proporciona como una preparación multidosis. La presente invención, sin embargo, explícitamente se dirige también a formulaciones destinadas a un único uso. La presente invención también se refiere a la estabilización de formulaciones como parte de un kit. Tal kit comprenderá al
25 menos un recipiente que comprende una o más dosis diarias de FSH, o por ejemplo dos recipientes (por ejemplo un vial), que comprende cada uno una gonadotropina diferente, y por ejemplo instrucciones adicionales (por ejemplo para la administración) y por ejemplo medios adicionales para inyección. En una realización preferida, se utiliza una pluma de inyección para múltiples inyecciones, con lo que la solución FSH se carga en cartuchos respectivos.

30 En una realización preferida, la FSH está comprendida en 35 - 850 UI/ml, preferiblemente 50 -800 UI/ml, incluso más preferiblemente 100 - 600 UI/ml.

Una formulación particularmente preferida para por ejemplo 600 UI/ml de rFSH tiene la siguiente composición:

600 UI/ml de rFSH

0,001 - 0,05, preferiblemente 0,005 mg/ml, de Polisorbato 20

0,1 a 10, preferiblemente 1,0 mg/ml, de L-metionina

35 0,5 a 50, preferiblemente 5;0 mg/ml, de fenol

1 a 100, preferiblemente 14 mg/ml, de sulfato disódico (es decir 0,1 M)

0,1 a 10, preferiblemente 1 mM de tampón fosfato sódico (pH 6 a 8, preferiblemente pH 6,5).

La osmolalidad de la solución preferiblemente es 300 mosmol/kg

(El pH se refiere al pH de la solución global.)

40 Formas de depósito inyectables se pueden realizar formando matrices microencapsuladas de FSH (y otros agentes, si están presentes) en polímeros biodegradables. Las formas de depósito a base de polímero/sistemas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, ser por ejemplo micro- o nanopartículas, hidrogeles, micelas, emulsiones o implantes. Dependiendo del ratio de FSH con respecto al polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar el ratio de liberación de FSH. Ejemplos de polímeros biodegradables incluyen
45 sistemas de copolímeros de polilactida/poliglicolida, polivinilpirrolidona, poli(ortoésteres), poli(anhídridos), poli(etilenglicol), poliaminoácidos, polisacáridos, por ejemplo hialuronato sódico (NaHA) u otras sales de los mismos, gelatina, quitosano etc. Todos los polímeros mencionados se pueden derivatizar o modificar para optimizar la

administración de fármacos proteínicos o su estabilidad. Las formulaciones de depósito inyectables también se preparan atrapando el FSH en sistemas lipídicos, o mezclas de polímeros y lípidos tales como micelas, liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales.

5 Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriológico, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio estéril inyectable justo antes de su utilización. Las formulaciones inyectables se pueden suministrar en cualquier recipiente adecuado, por ejemplo vial, jeringa precargada, cartuchos de inyección, y similares, como descrito anteriormente.

10 El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con la práctica habitual en este campo. Ver *GOODMAN and GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS*, 7ª edición. En una realización preferida, las composiciones de la invención se suministran como composiciones para administración parenteral. Métodos generales para la preparación de formulaciones parenterales son conocidos en la técnica y se describen en *REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY*, *supra*, en las páginas 780-820. Las composiciones parenterales se pueden suministrar en formulación líquida o como un sólido que se mezclará con un medio estéril inyectable justo antes de su administración. En una realización especialmente preferida, las composiciones parenterales se suministran en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación.

15 La FSH de la presente invención se puede derivar mediante medios convencionales a partir de orina o se puede producir de manera recombinante. Para posibles métodos de producción se hace referencia adicionalmente a por ejemplo WO 2009/127826.

20 Se puede obtener hCG mediante cualquier medio conocido en la técnica. hCG tal y como se usa aquí incluye hCG de origen humano y recombinante. hCG de origen humano se puede purificar a partir de cualquier fuente apropiada (por ejemplo, orina y placenta) mediante cualquier método conocido en la técnica. Son bien conocidos en la técnica métodos para expresar y purificar hCG recombinante.

25 Se puede obtener LH mediante cualquier medio conocido en la técnica. LH, tal y como se usa aquí, incluye LH de origen humano y recombinante. LH de origen humano se puede purificar a partir de cualquier fuente apropiada (por ejemplo orina) mediante cualquier método conocido en la técnica. Son conocidos en la técnica métodos para expresar y purificar LH recombinante.

30 La composición farmacéutica puede ser para el tratamiento de infertilidad, por ejemplo para uso en por ejemplo tecnologías de reproducción asistida (TRA), inducción de ovulación (IO) o inseminación intrauterina (IIU). La composición farmacéutica se puede utilizar, por ejemplo, en indicaciones médicas donde se utilizan preparaciones de FSH conocidas. La presente invención también proporciona el uso de la preparación de FSH estabilizada descrita aquí (de acuerdo con aspectos de la invención) para, o en la fabricación de un medicamento para, el tratamiento de la infertilidad. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en composiciones bien conocidas para cualquier vía de administración de fármacos, por ejemplo oral, rectal, parenteral, transdérmica (por ejemplo, tecnología de parches), intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, ungüentos o gotas) o como una pulverización bucal o nasal. Una composición típica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución acuosa, excipientes no tóxicos, incluyendo sales y conservantes, tampones y similares, como se describe en *Remington's Pharmaceutical Sciences 15ª edición (Matt Publishing Company, 1975)*, en páginas 1405 a 1412 y 1461 a 87, y *the national formulary XIV 14ª edición (American Pharmaceutical Association, 1975)*, entre otros.

35 Ejemplos de vehículos farmacéuticos acuosos y no acuosos, diluyentes, disolventes o vehículos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tal como aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo.

45 Las composiciones también pueden contener aditivos tales como, pero no limitados a, conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponantes, y agentes dispersantes. También se pueden incluir agentes antibacterianos y antifúngicos para prevenir el crecimiento de microbios e incluye, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenoles, ácido sórbico, y similares. Además, puede ser deseable incluir agentes de tonicidad.

50 En algunos casos, para lograr una acción prolongada, es deseable ralentizar la absorción de FSH (y de otros ingredientes activos, si están presentes) a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con escasa solubilidad en agua. La velocidad de absorción de por ejemplo FSH depende entonces de su velocidad de disolución la cual, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma combinada de FSH administrada de forma parenteral se consigue disolviendo o suspendiendo la combinación FSH en un vehículo oleoso.

Según la presente invención, los inventores hicieron un esfuerzo para investigar el efecto de ciertos compuestos sobre la estabilidad de una formulación líquida de gonadotropina; aquí, se investigaron tanto efectos estabilizantes como también desestabilizantes de ciertos compuestos.

5 El término "estabilidad" puede referirse a estabilidad química, implicando modificación covalente de la secuencia de aminoácidos, pero en el contexto de la estabilidad proteica también se puede referir a estabilidad física, lo cual implica cambios en el estado plegado de proteínas (es decir, el estado nativo) no incluyendo escisión de enlace covalente.

10 En la presente invención el término "estabilidad" se refiere a la estabilidad física de formulaciones de gonadotropinas, en particular FSH de la presente invención. La inestabilidad física de una formulación proteica puede ser causada por agregación de las moléculas proteicas para formar agregados de orden superior, por disociación de los heterodímeros en monómeros, o por cualquier otro cambio conformacional que reduzca al menos una actividad biológica de proteínas de FSH incluidos en la presente invención.

15 Una solución o formulación "estable" es una donde el grado de agregación, disociación, modificación conformacional, pérdida de actividad biológica y similares, de las proteínas en ella, se controla de manera aceptable, y no aumenta de manera inaceptable con el tiempo. La estabilidad puede valorar mediante métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo medición de dispersión de luz de una muestra, inspección visual de la transparencia y/o coloración, absorbancia, o densidad óptica, determinaciones de tamaño molecular (por ejemplo mediante cromatografía de exclusión por tamaño o fraccionamiento de flujo de campo), actividad biológica *in vitro* o *in vivo* y/o mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Otros métodos para valorar la estabilidad son bien conocidos en la técnica y también se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención.

20 Se sabía que varios conservantes tienen un pronunciado efecto desestabilizante sobre formulaciones de gonadotropina y sorprendentemente se ha encontrado aquí que Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 , los cuales se ha demostrado aquí que son adecuados para la estabilización de una formulación líquida de FSH, son útiles adicionalmente para contrarrestar los efectos desestabilizantes de un conservante, como alcohol bencílico, fenol y m-cresol, los cuales necesitan estar comprendidos en una formulación líquida multidosis de FSH para uso médico.

25 Las sales aquí reivindicadas tienen un efecto estabilizante sobre una formulación líquida de FSH, el cual es, de manera ventajosa y sorprendente, aún más pronunciado que los efectos estabilizantes de estabilizantes conocidos, como por ejemplo sacarosa. El efecto estabilizante mejorado en comparación con estabilizantes conocidos como sacarosa es particularmente sorprendente. Además, de manera bastante inesperada, se pudieron demostrar los efectos estabilizantes de las sales inventivas para formulaciones de FSH, aunque no se pudo demostrar ningún efecto estabilizante para la hCG muy similar. Además fue sorprendente que los efectos de estabilidad como observados no obedecían a las llamadas series de Hofmeister (ver también más adelante), sino que en realidad iba en contra de ella.

30 Se ha sabido del estado de la técnica que hay degradación de FSH que se da en formulaciones farmacéuticas de FSH y esto ha sido confirmado por el primer conjunto de los presentes ejemplos.

35 FSH se degradará tanto como una función del tiempo, como también como una función de la temperatura. En particular, a temperaturas superiores a temperatura ambiente, se alteran las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias.

Parece ser que el despliegue conformacional de estructuras terciarias y secundarias de FSH que se dan tras calentar es una transición de dos estados (cuando está limitada la agregación de proteínas). Este despliegue puede ser independiente de la disociación de la subunidad (cambios en la estructura cuaternaria).

40 Además, se pone de manifiesto con la presente invención que la FSH, que contiene un conservante como alcohol bencílico o fenol, donde son necesarios tales conservantes, por ejemplo, como agentes antimicrobianos en formulaciones líquidas de FSH, claramente afectan la estabilidad de formulaciones multidosis de FSH de una manera negativa. Aquí, la estabilidad a largo plazo de FSH disminuye, la temperatura de desnaturalización de FSH es más baja, y las formas ya desnaturalizadas tienen un nivel más bajo de estructuras secundarias que formulaciones de FSH que no contienen conservantes.

45 La presente invención también muestra por primera vez que Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 , tienen un efecto significativo sobre la estabilidad de las formulaciones líquidas de FSH. Se pudo demostrar que la estructura secundaria de FSH en formulaciones líquidas de FSH que comprenden estas sales no cambiará significativamente tras calentar hasta $76,5^\circ\text{C}$. La forma desnaturalizada está relativamente estructurada en la presencia de Na_2SO_4 , esto hace la desnaturalización más reversible, y por lo tanto, aumenta significativamente la estabilidad cinética de la proteína. Esto está respaldado por los datos de estabilidad en tiempo real aquí mostrados que muestran un efecto estabilizante pronunciado sobre la estructura heterodimérica de FSH.

Los resultados aquí indican claramente que las sales aquí reivindicadas, es decir, Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 pueden limitar la tendencia de las moléculas de FSH a disociarse y así aumentar significativamente la estabilidad de almacenamiento.

5 La presente invención también se refiere a un método para estabilización de una formulación líquida de FSH donde el método comprende la etapa de una adición de las sales anteriores a dicha formulación.

Todos los estudios se confirmaron mediante los datos en tiempo real llevados a cabo adicionalmente.

Breve Descripción de los Dibujos

Figura 1:

10 Se muestra la señal de DC (dicroísmo circular, ver abajo) (mdeg) como función de la longitud de onda (nm) para rFSH a diversas temperaturas. No se observó diferencia significativa entre los espectros a $24,0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 45,9\text{ }^\circ\text{C}$, pero se observó una disminución dependiente de la temperatura de la señal DC más allá de $50\text{ }^\circ\text{C}$. La proteína rFSH ($0,93\text{ mg/ml}$) se disolvió en $3,57\text{ mM}$ de tampón fosfato pH $6,3$ que contiene $0,0036\text{ mg/ml}$ de Polisorbato 20. Barrido a $24,0\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado continuo en negrita), $50,3\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado de guiones), $54,7\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado de puntos), $59,0\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado de guiones y puntos), $63,4\text{ }^\circ\text{C}$ (asteriscos), $67,8\text{ }^\circ\text{C}$ (rombos) y $76,5\text{ }^\circ\text{C}$ (trazo sólido).

15 Figura 2:

Se muestra la señal de DC (mdeg) como una función de longitud de onda (nm) para rFSH que contiene Na_2SO_4 a diversas temperaturas. No se observó ninguna diferencia significativa entre los espectros a $24,0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 45,9\text{ }^\circ\text{C}$. La proteína rFSH se disolvió en $3,57\text{ mM}$ de tampón fosfato pH $6,3$ que contiene $0,0036\text{ mg/ml}$ de Polisorbato 20 y $8,5\text{ mg/ml}$ de sulfato sódico (Na_2SO_4). Barrido a $24,0\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado continuo en negrita), $50,3\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado de guiones), $54,7\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado de puntos), $59,0\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado de guiones y puntos) y $76,5\text{ }^\circ\text{C}$ (trazo sólido).

20 Figura 3:

Se muestra la señal de DC (mdeg) como una función de longitud de onda (nm) para rFSH que contiene alcohol bencílico a diversas temperaturas. No se observó ninguna diferencia significativa entre los espectros a $24,0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 45,9\text{ }^\circ\text{C}$. La proteína rFSH ($0,93\text{ mg/ml}$) se disolvió en $3,57\text{ mM}$ de tampón fosfato pH $6,3$ que contiene $0,0036\text{ mg/ml}$ de Polisorbato 20 y $0,17\text{ mg/ml}$ de alcohol bencílico. Barrido a $24,0\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado continuo en negrita), $45,9\text{ }^\circ\text{C}$ (círculos), $50,3\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado de guiones), $54,7\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado de puntos), $59,0\text{ }^\circ\text{C}$ (trazado de guiones y puntos), $63,4\text{ }^\circ\text{C}$ (asteriscos), $67,8\text{ }^\circ\text{C}$ (rombos) y $76,5\text{ }^\circ\text{C}$ (trazo sólido).

Figura 4:

30 Barridos subsiguientes de DSC (calorimetría diferencial de barrido) de hCG y rFSH. Datos de DSC para 5 mg/ml de hCG en $0,005\text{ mg/ml}$ de Polisorbato 20, $0,5\text{ mg/ml}$ de L-metionina, 1 mM de tampón fosfato, pH $6,5$ y $2,4\text{ mg/ml}$ de rFSH en $0,005\text{ mg/ml}$ de Polisorbato 20, $0,5\text{ mg/ml}$ de L-metionina, $0,24\text{ M}$ de NaCl , 1 mM de tampón fosfato, pH $6,5$. Velocidad de barrido $2,0\text{ }^\circ\text{C/min}$. Primer barrido de rFSH (trazado sólido), segundo barrido de rFSH (trazado de guiones), primer barrido de hCG (trazo de guiones) y segundo barrido de hCG (trazo de puntos). Después del primer barrido la muestra se enfrió hasta $20\text{ }^\circ\text{C}$ antes del segundo barrido.

35 Figura 5:

Barridos DSC de hCG con diversos azúcares o sales. Datos DSC para 5 mg/ml de hCG en $0,005\text{ mg/ml}$ de Polisorbato 20, $0,5\text{ mg/ml}$ de L-metionina y 1 mM de tampón fosfato, pH $6,5$. Ningún azúcar o sal añadidos (trazado continuo en negrita), $0,1\text{ M}$ de Na_2SO_4 (trazado sólido), $0,1\text{ M}$ de NaCl (trazado de puntos), $0,1\text{ M}$ de NaClO_4 (trazado de guiones) y $0,1\text{ M}$ de sacarosa (trazado de guiones y puntos). Velocidad de barrido $2,0\text{ }^\circ\text{C/min}$.

40 Figura 6:

Barridos DSC de rFSH con diversos azúcares y sales. Datos DSC para $2,4\text{ mg/ml}$ de rFSH en $0,005\text{ mg/ml}$ de Polisorbato 20, $0,5\text{ mg/ml}$ de L-metionina y 1 mM de tampón fosfato, pH $6,5$. Ningún azúcar o sal añadidos (trazado continuo en negrita), $0,1\text{ M}$ de Na_2SO_4 (trazado sólido), $0,1\text{ M}$ de NaCl (trazado de puntos), $0,1\text{ M}$ de NaClO_4 (trazado de guiones) y $0,1\text{ M}$ de sacarosa (trazado de guiones y puntos). Velocidad de barrido $1,0\text{ }^\circ\text{C/min}$.

45 La presente invención se explica adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos, los cuales, sin embargo, de ninguna manera se deberán interpretar como que limitan el alcance de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1- Espectroscopía de Dicroísmo Circular de Radiación de Sincrotrón (SRCD)

MÉTODO

- Se llevó a cabo espectroscopía de dicroísmo circular utilizando una instalación de sincrotrón en la Universidad de Aarhus, Dinamarca. Todos los espectros de DC se registraron utilizando una cubeta de cuarzo Suprasil con longitud de trayectoria de 0,1 mm (Hellma GmbH, Alemania) a lo largo de un intervalo de longitud de onda de 180-270 nm en pasos de 1 nm, y con un tiempo de permanencia de 3 segundos por longitud de onda. Se registraron tres barridos de DC idénticos para cada ensayo experimental, tanto para los ensayos de rFSH como para los de referencia (placebo). El espectro de DC de rFSH presentado en este informe se obtuvo restando el barrido promedio del placebo correspondiente del barrido promedio de la proteína. Para cada conjunto de barridos de DC se utilizaron aproximadamente 120 µl de solución (corresponde a aproximadamente 112 µg de rFSH).
- Durante las investigaciones de los efectos de temperatura sobre el espectro de DC de rFSH, la temperatura en la cámara de calentamiento se varió desde 25 °C hasta 85 °C con intervalos de 5 °C, y un tiempo de equilibrado de 5 minutos. Se determinó la temperatura experimental real (temperatura en la cubeta de cuarzo Suprasil) a partir de un archivo de calibración.
- El DC mide la diferencia en la absorción de luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha, la cual se produce debido a asimetría estructural.
- Se pueden investigar estructuras secundarias de proteínas mediante espectroscopia de DC en la región de UV lejano (aproximadamente 180- 250 nm). En general, una estructura más ordenada coincide con señales de DC más intensas (positivas o negativas). Sin embargo, diferentes estructuras secundarias tienen diferentes espectros de DC, y como hélices α tienen señales de DC más intensas que estructuras β , no se pueden realizar comparaciones directas entre diferentes proteínas a concluir a partir del grado de estructuras ordenadas.
- Debido a la alta sensibilidad frente a cambios estructurales, la espectroscopia de DC es una potente herramienta cuando se investiga estabilidad física de proteínas. Estos estudios habitualmente se realizan detectando un espectro de DC como función de cambios en factores externos, por ejemplo, temperatura, pH, concentración de desnaturalizantes, tensioactivos o estabilizantes. En el presente estudio se investiga el espectro de DC de FSH recombinante en función de la temperatura. Adicionalmente se han estudiado los efectos del alcohol bencílico y sulfato sódico (Na_2SO_4) sobre la estructura secundaria de rFSH.
- La gonadotropina utilizada en este ejemplo, así como en los Ejemplos 2 y 3, es una Hormona Folículo Estimulante recombinante (rFSH), una hormona humana que se expresa por la línea celular humana PER.C6[®] que utiliza tecnología de ADN recombinante. rFSH es una proteína heterodimérica que consiste en dos monómeros glicosilados: una subunidad alfa de 92 aminoácidos que es común para FSH, Hormona Luteinizante (LH), Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) y Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH), y una subunidad beta de 111 aminoácidos que es específica para FSH. Las hormonas de glicoproteína, que comprenden FSH, todas pierden su bioactividad tras la disociación de los monómeros acoplados de forma no covalente.
- Resultados previos han indicado que la inestabilidad de rFSH se basa principalmente en la disociación dimérica (descomposición de la estructura cuaternaria, y disminución concomitante en la respuesta de unión inmune).
- En dependencia del uso previsto, las formulaciones de rFSH actualmente comercializadas se proporcionan en diferentes concentraciones, que van desde 37,5 UI/ml (correspondientes a aproximadamente 2,8 µg/ml para Gonal-f) hasta por lo menos 833 UI/ml (que corresponde a aproximadamente 83,3 µg/ml para Puregon).
- La rFSH utilizada en los estudios está destinada a una formulación líquida de producto farmacológico, 600 UI de rFSH/ml para inyección subcutánea. Dado que el producto está destinado para inyección multidosis, es necesaria la adición de un conservante.
- Las formulaciones investigadas se produjeron mezclando soluciones madre de los diferentes ingredientes. El intervalo investigado de concentración tanto de la proteína como de los excipientes es limitada debido al método utilizado, es decir la concentración de proteína necesaria para mantenerse relativamente alta en comparación con las concentraciones de excipiente. Debido a la absorción UV de los compuestos aromáticos en la región de longitud de onda investigada, la concentración de alcohol bencílico se tuvo que mantener baja. La siguiente tabla resume las tres formulaciones diferentes que han sido examinadas en un primer diseño experimental por los presentes inventores.

Tabla 1

- La tabla muestra el contenido de las tres formulaciones que se utilizaron para estudios de SRCD de los efectos de la temperatura sobre rFSH

Muestra	Contenido
1	0,93 mg/ml de rFSH, 3,6 µg/ml de Polisorbato 20, 3,57 mM de tampón fosfato pH 6,3
2	0,93 mg/ml de rFSH, 3,6 µg/ml de Polisorbato 20, 8,6 mg/ml de Na ₂ SO ₄ , 3,57 mM de tampón fosfato pH 6,3
3	0,93 mg/ml de rFSH, 3,6 µg/ml de Polisorbato 20, 0,17 mg/ml de alcohol bencílico, 3,57 mM de tampón fosfato pH 6,3

Muestra 1

Se registró el espectro de DC para rFSH, muestra 1 (ver tabla 1) a trece temperaturas diferentes entre 24 °C y 77 °C. Para mayor claridad solamente siete de estos espectros se muestran en la figura 1. La muestra 1, como se deriva de la Tabla 1, no comprendía ni una sal, ni un conservante. Los espectros se muestran en la figura 1. Los resultados muestran claramente que la intensidad de la señal de DC disminuye como una función de la temperatura, lo cual indica la descomposición de estructuras secundarias a alta temperatura (> 50 °C). No se detectaron diferencias significativas entre los espectros a 24,0 °C → 45,9 °C, lo cual muestra que durante el período de tiempo de las mediciones (alrededor de 20 minutos) la estructura secundaria de la proteína está intacta tras calentar hasta aproximadamente 46 °C. Los espectros de SRCD de FSH tras calentar muestran un punto isodicroico a aproximadamente 193 nm, lo cual también se encuentra para los espectros de la Muestra 2, ver la figura 2.

Muestra 2

Se registró el espectro de DC para rFSH, muestra 2 (tabla 1) que contiene Na₂SO₄. Los espectros se obtuvieron a trece temperaturas diferentes entre 24 °C y 77 °C, y se presentan en la figura 2. Para mayor claridad solamente cinco de estos espectros se muestran en la figura 2. Los resultados muestran la descomposición de estructuras secundarias como una función de la temperatura. Los datos revelan que la estructura secundaria de rFSH en la muestra 2 está intacta tras calentar hasta aproximadamente 46 °C (en la duración del experimento). De manera relevante, los datos también muestran que la forma desnaturalizada está relativamente estructurada en la presencia de Na₂SO₄.

Muestra 3

Se registró el espectro de DC para rFSH, muestra 3 (tabla 1) que contiene alcohol bencílico (AB). El alcohol bencílico es un conservante antimicrobiano que se selecciona con bastante frecuencia para una formulación líquida de FSH. Debido a la capacidad de conservación relativamente débil en comparación con, por ejemplo, m-cresol, AB tiene que ser utilizado a concentraciones elevadas (aproximadamente 10-15 mg/ml). Es necesario un conservante ya que el uso previsto de la rFSH es para varias inyecciones a lo largo de un período de tiempo de hasta 1 mes, y debido a que la rFSH habitualmente se almacena a temperatura ambiente.

Los espectros de rFSH en la presencia de 0,17 mg/ml de AB se obtienen a trece temperaturas diferentes entre 24 °C y 77 °C, y se presentan en la figura 3. Para mayor claridad solamente ocho de estos espectros se muestran en la figura 3.

Debido a la muy alta absorbancia de UV del alcohol bencílico (y la señal de DC concomitantemente baja) la concentración de AB investigada no se pudo incrementar, y por lo tanto no pudo ni siquiera llegar cerca de la concentración que se utilizará para conservar formulaciones de rFSH. Sin embargo, se observó un claro efecto desestabilizante de AB. Los resultados de DC indican que la estructura secundaria de rFSH en la muestra 3 está intacta tras calentar hasta 42 °C, lo cual es ligeramente inferior a la temperatura de inicio de desnaturalización de rFSH en las muestras 1 y 2.

Adicionalmente, y de manera importante, los datos muestran que las formas desnaturalizadas carecen de estructura ordenada en un grado notablemente mayor que FSH en la ausencia de conservante.

Los efectos de excipientes sobre cambios estructurales inducidos por temperatura

La sal Na₂SO₄ que se utilizó aquí como un ejemplo representativo de las sales aquí reivindicadas mostró un efecto significativo sobre la estructura de proteínas desnaturalizadas por temperatura. Esto es claramente un hallazgo importante. Como proteínas desnaturalizadas (desplegadas o parcialmente desplegadas) son más propensas a asociarse para formar agregados que proteínas nativas (*Fink, AL, 1998, Fold Des 3(1):R9-R23*), los resultados indican que el sulfato sódico puede limitar la tendencia de moléculas de rFSH a desnaturalizarse y por lo tanto el riesgo de agregación y de este modo aumenta significativamente la estabilidad de almacenamiento. El alcohol bencílico (AB) por otro lado induce descomposición estructural significativa a altas temperaturas. No se detectaron estructuras secundarias ordenadas mediante SRCD. Los efectos observados de AB (más estructuras desplegadas) pueden ser parte de la explicación del aumento de la agregación incrementada encontrado en otros sistemas proteicos tras la adición de

alcohol bencílico (Maa, Y. y Hsu, C.C., 1996, *Int. J. Pharm.* 140:155-168 ; Zhang, Y. et al., 2004, *J. Pharm. Sci.* 93(12):3076-3089).

5 Sin embargo, la adición de conservantes es crucial para el desarrollo de formulaciones multidosis, y es conocido a partir de la existencia de productos de rFSH en el mercado que es necesario desarrollar formulaciones más estables incluso con contenido relativamente alto de alcohol bencílico (Puregon® contiene 10 mg/ml de alcohol bencílico).

Se encontró que alcohol bencílico disminuye la estabilidad de rFSH y favorece la pérdida de estructuras secundarias ordenadas tras calentar. Sin embargo, es importante una adición de conservantes. Este estudio demostró que las sales aquí reivindicadas incrementan el nivel de estructuras ordenadas en formulaciones de rFSH calentadas.

10 Por lo tanto, estas sales son muy adecuadas como estabilizante(s) en una formulación líquida de rFSH, por ejemplo para compensar los efectos del alcohol bencílico u otros conservantes fenólicos.

Ejemplo 2 - Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

15 La FSH utilizada de forma representativa en este ejemplo es la misma que en el Ejemplo 1. En general, la estructura nativa (bioactiva) de las proteínas es muy sensible hacia su entorno, por ejemplo la composición de la formulación, el sistema de recipientes, pH y temperatura. En el presente ejemplo la temperatura de desnaturalización de rFSH, T_m , ha sido investigada mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) líquida. La temperatura de desnaturalización de rFSH proporciona una indicación de la estabilidad de la proteína en solución, donde una mayor T_m indica una proteína más estable.

20 La estructura terciaria y cuaternaria de proteínas se estabiliza principalmente mediante interacciones no covalentes. Dado que muchas de estas interacciones intramoleculares se sustituyen por interacciones no covalentes con moléculas de agua durante el despliegue, el equilibrio termodinámico entre las diferentes formas estructurales (es decir nativas y desnaturalizadas) es sutil. En general, esto significa que la estabilidad de proteínas nativas es limitada. Muchas proteínas se despliegan térmicamente alrededor de 70 °C. El plegamiento o desnaturalización de proteínas se pueden describir mediante parámetros termodinámicos que se pueden estudiar y cuantificar directamente usando DSC. Por lo tanto, DSC es una herramienta importante para estudiar los efectos de los excipientes sobre la estabilidad de la proteína, y por lo tanto para identificar formulaciones óptimas para proteínas terapéuticas.

CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) LÍQUIDA

Teoría

30 Cuando se calienta una muestra proteica (es decir, se incrementa la temperatura de la muestra) en una DSC líquida, solamente se obtiene una línea de base ligeramente en aumento, pero cuando continúa el calentamiento (es decir continua el incremento de temperatura), el calor es absorbido por la proteína provocando que se despliegue térmicamente a lo largo de un intervalo de temperatura característico para la proteína estudiada. Esto da lugar a un máximo endotérmico. Durante el despliegue de proteínas, moléculas de agua que rodean la proteína se reorganizan ya que son expuestas cadenas más hidrófobas. Cuando el despliegue es completo, la absorción de calor disminuye y se forma una nueva línea de base.

35 La integración de la capacidad calorífica, C_p , de la muestra proporciona el cambio de entalpía, ΔH , asociado con el proceso de despliegue de la ecuación (1). El cambio de entalpía observado se origina de procesos endotérmicos tales como la rotura de enlaces de hidrógeno y procesos exotérmicos tales como formación de enlaces de hidrógeno entre la proteína y el medio circundante. El punto medio de la transición térmica o punto medio de transición, T_m (a menudo denominado la temperatura de desnaturalización de proteínas), es la temperatura cuando la mitad de las moléculas de proteína están plegadas y la mitad de las moléculas de proteína están desplegadas.

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \quad (1)$$

Los datos en bruto de las mediciones de DSC, es decir, la tasa de calentamiento (en W) como una función de la temperatura se podría recalculer fácilmente a una capacidad calorífica parcial molar (en J/mol K), conociendo la masa molar y la concentración de la proteína utilizada.

Método de ensayo

45 La temperatura de desnaturalización de proteína, T_m , se midió utilizando una DSC líquida, Nano DSC de TA Instruments, equipada con cubetas de doble capilaridad de 300 μ l y utilizando los siguientes parámetros:

Velocidad de barrido: 0,5-2,0 °C/min, si no se indica otra cosa, se utiliza una velocidad de barrido de 1,0 °C/min (2,0 °C/min para ejemplo 4)

Temperatura de inicio: 20 °C

Temperatura final: 100 °C

5 Equilibrio: 900 s (o 900 s (primer barrido) 600 s (segundo barrido) para ejemplo 4)

Presión constante: 3 atm

Todas las muestras se desgasificaron durante 15 min antes de las mediciones. Las cubetas de la muestra se lavaron con ácido fórmico al 50% después de cada muestra de proteína. Adicionalmente se aclararon las cubetas con 1000 ml de agua purificada después de cada ejecución de muestra.

10 Todas las muestras se midieron con el placebo correspondiente en la cubeta de referencia. Los resultados de un barrido por separado llenando tanto la cubeta de referencia como la de muestra con la solución de placebo, se restaron de los datos antes de la evaluación, es decir, una sustracción del blanco.

MALDI-TOF MS

15 Se analizaron muestras de rFSH, antes y después del tratamiento con la enzima sialidasa, mediante Espectrometría de Masas de Desorción/Ionización mediante Láser Asistida por Matriz y Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF MS) para evaluar la extensión de la reacción de desialilación. Se obtuvieron espectros en un Espectrómetro de Masas Autoflex II MALDI ToF (Bruker Daltonics). Se utilizó ácido sinápico como matriz.

Se realizó el análisis en el modo lineal de iones positivos, con extracción retardada. Se utilizó un intervalo de barrido de 4000-20893 Da con calibración externa.

20 EL OBJETO DE ESTE EJEMPLO

El objetivo de este ejemplo fue investigar la estabilidad térmica de rFSH por medio de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) líquida, y para estudiar el efecto estabilizante de diferentes sales sobre rFSH con y sin adición de un conservante (fenol o alcohol bencílico).

25 Este estudio junto con los estudios espectroscópicos previos de dicroísmo circular (DC) (Ejemplo 1 anterior) y estudios de estabilidad en tiempo real (Ejemplo 3 más adelante) todos tienen como objetivo estudiar el efecto de sales y conservantes sobre la estabilidad de rFSH en soluciones.

PRODUCTOS A SER ESTUDIADOS

INFORMACIÓN DE LOTE DE rFSH

30 rFSH, sustancia farmacológica lote N° 08800020 y lote N° 09PD80010 fueron fabricados por Bio-Technology General (BTG), Israel.

La determinación de la actividad biológica de rFSH se lleva a cabo según la Farmacopea Europea (Ph. Eur). La concentración se determinó que era 13.223 UI/mg (resultando en 9256 UI/ml) para el lote 08800020 y 15.109 UI/mg (resultando en 10.576 UI/ml) para el lote 09PD80010, respectivamente, para los dos lotes de rFSH usados.

MATERIALES

35 Excipientes

En la Tabla 2 se enumera un listado de los excipientes utilizados en las soluciones de rFSH en este estudio.

Tabla 2: Listado de excipientes

Nombre	Proveedor
Hidrógeno fosfato disódico × 2 H ₂ O, Ph. Eur.	Merck
Ácido fosfórico al 85%, Ph. Eur.	Merck
Cloruro sódico, Ph. Eur.	Merck
Sulfato disódico × 10 H ₂ O, Ph.Eur.	Merck
Cloruro de magnesio × 6 H ₂ O, Ph.Eur.	Merck
Cloruro potásico, p.a.	Merck
Yoduro sódico, Ph. Eur.	Merck
Sulfato amónico, Ph. Eur.	Merck
Yoduro potásico, Ph. Eur.	Merck
Cloruro de zinc, Ph. Eur.	Riedel-de-Haën
Citrato trisódico × 2 H ₂ O, Ph.Eur.	Merck
Acetato amónico, Ultra > 99,0%	Fluka
Acetato sódico, × 3 H ₂ O, Ph.Eur.	Merck
Perclorato sódico × H ₂ O, p.a.	Merck
Yoduro de zinc, p.a.	Merck
Sulfato de zinc, Ph. Eur.	Merck
Sulfato dipotásico, Ph. Eur.	Merck
Tartrato disódico × 2 H ₂ O, p.a.	Merck
Yoduro amónico, p.a.	Merck
Sacarosa, Ph. Eur.	Merck
Hidrógeno fosfato dipotásico × 3 H ₂ O, p.a.	Merck
Sulfato de magnesio × 7 H ₂ O, Ph.Eur.	Fluka
Polisorbato 20 (Tween 20) Ph. Eur.	Merck
Fenol, Ph. Eur.	Merck
Alcohol bencílico, Ph. Eur.	Merck
L-metionina, Ph. Eur.	Sigma
Agua Milli-Q	Millipore

COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES ENSAYADAS

5 La composición de las soluciones de rFSH y placebo ensayadas están enumeradas en la Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5. La concentración ensayada de los conservantes se elige basada en la concentración requerida para cumplir con la Ph. Eur. Un criterio relativo a la eficacia de conservación de una formulación destinada a uso parenteral.

10 Las concentraciones de sal ensayadas se basan en la concentración de sulfato sódico necesaria para obtener isotonicidad en las soluciones ensayadas, es decir, 0,1 M de sulfato sódico. Todas las demás sales se ensayan a la misma concentración molar que sulfato sódico. Adicionalmente se ensaya una concentración mayor y menor de cloruro sódico, para evaluar el efecto de la concentración de sal sobre la temperatura de desnaturalización de rFSH, T_m.

La concentración de tampón fosfato sódico de las soluciones ensayadas se mantiene baja, para minimizar el riesgo de efectos estabilizantes/desestabilizantes de las sales tampón como tales.

Tabla 3: Composición de soluciones de rFSH

rFSH	Tampón	Tensioactivo	Conservante	Antioxidante	Estabilizante
2,4 mg/ml	1 mM de tampón de fosfato pH 5,5 o pH 6,5 o pH 7,5	0,005 mg/ml Polisorbato 20	5 mg/ml de fenol o 15 mg/ml de alcohol bencílico o ninguno	0,5 mg/ml de L-metionina	0,1 M de Na ₂ SO ₄ o 0,24 M de NaCl o 0,1 M de NaCl o 0,07 M de NaCl o 0,1 M de acetato de Na o 0,1 M de citrato de Na ₃ o 0,1 M de tartrato de Na ₂ o 0,1 M de NaI o 0,1 M de NaClO ₄ o 0,1 M de K ₂ SO ₄ o 0,1 M de K ₂ HPO ₄ o 0,1 M de KCl o 0,1 M de KI o 100 mM de (NH ₄) ₂ SO ₄ o 0,1 M de acetato de NH ₄ o 0,1 M de NH ₄ I o 0,1 M de MgSO ₄ o 0,1 M de MgCl ₂ o 0,1 M de ZnSO ₄ o 0,1 M de ZnCl ₂ o 0,1 M ZnI ₂ o 0,1 M sacarosa o Ninguno

Tabla 4: Composición de soluciones de rFSH desialiladas

rFSH desialilada	Tampón	Tensioactivo	Antioxidante	Estabilizante
2,4 mg/ml	1 mM de tampón fosfato pH 6,5	0,005 mg/ml de Polisorbato 20	0,5 mg/ml L-metionina	0,1 M de Na ₂ SO ₄ o 0,1 M de NaClO ₄ o Ninguno

5 Tabla 5: Composición de soluciones de placebo

Tampón	Tensioactivo	Conservante	Antioxidante	Estabilizante
1 mM de tampón fosfato pH 5,5 o pH 6,5 o pH 7,5	0,005 mg/ml Polisorbato 20	5 mg/ml de fenol o 15 mg/ml de alcohol bencílico o ninguno	0,5 mg/ml de L-metionina	0,1 M de Na ₂ SO ₄ o 0,24 M de NaCl o 0,1 M de NaCl o 0,07 M de NaCl o 0,1 M de acetato de Na o 0,1 M de citrato de Na ₃ o 0,1 M de tartrato de Na ₂ o 0,1 M de NaI o 0,1 M de NaClO ₄ o 0,1 M de K ₂ SO ₄ o 0,1 M de K ₂ HPO ₄ o 0,1 M de KCl o 0,1 M de KI o 100 mM de (NH ₄) ₂ SO ₄ o 0,1 M de acetato de NH ₄ o 0,1 M de NH ₄ I o 0,1 M de MgSO ₄ o 0,1 M de MgCl ₂ o 0,1 M de ZnSO ₄ o 0,1 M de ZnCl ₂ o 0,1 M ZnI ₂ o 0,1 M sacarosa o Ninguno

PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN

Todas las soluciones (Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5) se fabrican a escala de laboratorio en Ferring Pharmaceuticals A/S, Copenhagen, Dinamarca. El procedimiento de fabricación se resume a continuación:

Preparación de la Solución Madre de rFSH

5 Las soluciones madre de rFSH en tampón fosfato se preparan añadiendo una etapa de concentración utilizando la solución del lote 08800020 o del lote 09PD80010 de rFSH como material de partida. La concentración se lleva a cabo utilizando un dispositivo Vivaspin 20 con una membrana con un corte de peso molecular (MWCO) de 10 kDa de Vivascience. La membrana se pre-lavó centrifugando 15 ml de la solución de placebo correspondiente, que contiene 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20 en 1 mM de tampón fosfato pH 5,5, 6,5 o 7,5 a través del filtro. La centrifugación se lleva a cabo a 3000 × g durante 20 minutos utilizando un rotor basculante.

10 Para llevar a cabo la etapa de concentración, se utilizaron un total de 80 ml de muestra de rFSH para llenar cuatro dispositivos Vivaspin 20 (20 ml por dispositivo) y se centrifugó a 3000 x g durante 15 min. Cada retenido se transfiere a un matraz volumétrico de 20 ml. Los filtros se lavan con pequeñas alícuotas de la solución de placebo deseado. La solución de lavado se transfiere al matraz volumétrico, que finalmente se diluye a volumen con la misma solución de placebo. Esto resulta en una solución madre de 2,8 mg/ml de rFSH que contiene 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20 en un tampón fosfato 1 mM, pH 5,5, 6,5 o 7,5, respectivamente.

Preparación de soluciones de rFSH y de placebo

Se preparan soluciones madre de todos los excipientes, excepto los conservantes, en agua Milli-Q.

20 Para la preparación de soluciones de rFSH y placebo, se mezclan soluciones madre de cada excipiente para obtener las concentraciones deseadas dadas en la Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5. El conservante se añade directamente a las soluciones.

Desialilación de rFSH

25 La solución concentrada de rFSH que tiene una concentración de rFSH de 2,8 mg/ml, que contiene 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20 en 1 mM de tampón fosfato pH 6,5 se utiliza para eliminar el ácido siálico de los restos de unidades de azúcar unidas a rFSH. La eliminación se realiza enzimáticamente, utilizando una $\alpha(2 \rightarrow 3, 6, 8, 9)$ Neuraminidasa (una sialidasa) de Sigma. La rFSH se trata con la Neuraminidasa durante toda la noche agitando a 37 °C. Se eliminan los reactivos utilizando dispositivos Vivaspin tal como descrito anteriormente para la concentración de rFSH. La solución de rFSH que contiene las enzimas se transfiere a un dispositivo Vivaspin prelavado. Se centrifuga el dispositivo, se descarga el filtrado y se re-suspende el retenido en una solución de placebo que contiene 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20 en 1 mM de tampón fosfato pH 6,5. La solución se centrifuga de nuevo. Este procedimiento se repite tres veces antes de transferir el retenido final a un matraz volumétrico y se diluye a volumen con la solución de placebo. Esto produce una solución madre de 2,8 mg/ml de rFSH desialilado que contiene 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20 en 1 mM de tampón fosfato de pH 6,5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**35 EFECTO DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO DE DSC SOBRE T_m de rFSH**

Para investigar el efecto de la velocidad de barrido de DSC sobre la temperatura de desnaturalización de rFSH, las mediciones de T_m se llevan a cabo con tres velocidades de barrido diferentes. Como se puede ver en la Tabla 6, la T_m de rFSH varía con la velocidad de barrido de DSC utilizada durante las mediciones.

40 Siempre que se comparen las temperaturas de desnaturalización obtenidas a partir de mediciones realizadas con velocidades de barrido idénticas, el hecho de que T_m varíe con la velocidad de barrido no afecta a la interpretación de los datos, ver por ejemplo la Tabla 7.

Tabla 6: Temperatura de desnaturalización, T_m , en relación a la velocidad de barrido para muestras de rFSH que contienen 2,4 mg/ml de rFSH, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20 en 1 mM de tampón fosfato sódico pH 6,5.

Velocidad de Barrido	T_m	
0,5 °C/min	71,9 °C	
1,0 °C/min	72,9 °C	
2,0 °C/min*	74,9 °C	Promedio = 74,6 °C
2,0 °C/min*	74,3 °C	

* Preparación y análisis de muestras por duplicado

La repetición de barridos DSC hasta 100 °C han demostrado que la desnaturalización de rFSH es parcialmente irreversible en las condiciones experimentales (ver la figura 4). Esto significa que el replegamiento es más lento que el tiempo de equilibrio entre dos barridos DSC, o que el despliegue está asociado con una etapa irreversible tal como se indica en la ecuación 2.



EFEECTO DE LA ADICIÓN DE UN CONSERVANTE SOBRE T_m de rFSH

Como se puede ver en la Tabla 7, la adición de un conservante a una solución de rFSH, disminuye la temperatura de desnaturalización, T_m , en 2-6 °C, dependiendo del conservante utilizado. Esto se corresponde bien con datos de informes anteriormente reportados tanto para otras proteínas recombinantes como para FSH derivada de orina.

La mayor disminución de la T_m obtenida para soluciones de rFSH con alcohol bencílico en comparación con soluciones de rFSH con fenol (ver la Tabla 7) se podría explicar a partir de la mayor concentración de alcohol bencílico (15 mg/ml) que de fenol (5 mg/ml) utilizada en los experimentos.

Tabla 7: Temperatura de desnaturalización con y sin adición de un conservante, T_m (conservante) y T_m (sin conservante), para muestras de rFSH que contienen 2,4 mg/ml de rFSH, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico pH 6,5 y los excipientes enumerados en la tabla. ΔT_m (conservante) = T_m (conservante) - T_m (sin conservante)

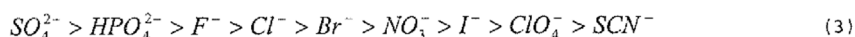
Conservante	Sal	T_m (sin conservante)	T_m (conservante)
5 mg/ml de fenol	Sin sal	72,9 °C*	70,2 °C*
		74,9 °C**	72,3 °C**
15 mg/ml de alcohol bencílico	Sin sal	74,9 °C**	70,1 °C**
5 mg/ml de fenol	0,1 M de Na ₂ SO ₄	78,0 °C	75,1 °C*
15 mg/ml de alcohol bencílico	0,1 M de Na ₂ SO ₄	78,9 °C**	73,3 °C

* Calculado a partir de mediciones DSC realizadas con una velocidad de barrido de 1,0 °C/min.

* Calculado a partir de mediciones DSC realizadas con una velocidad de barrido de 2,0 °C/min.

20 EFECTO DE LA ADICIÓN DE DIVERSAS SALES SOBRE T_m de rFSH

Clasificar sales de acuerdo con sus efectos generales sobre la solubilidad y estabilidad de la proteína es conocido como la serie de Hofmeister o series liotróficas, ecuación (3) a continuación. Los agentes de desalado en el lado izquierdo, los denominados iones cosmotrópicos son conocidos por producir un efecto estabilizante sobre las proteínas. Mientras que



los iones caotrópicos o salinizantes en el lado derecho, son conocidos por desestabilizar las proteínas.

25 Efecto de la Adición de Diversas Sales a Soluciones sin Conservante sobre T_m de rFSH

Cuando se mide el efecto de diversas sales sódicas sobre la T_m de rFSH, de manera bastante sorprendente, no se observó el efecto estabilizante/desestabilizante esperado de acuerdo con la serie de Hofmeister como descrito anteriormente, cuando se varían los cationes, ver la Tabla 8 y la Tabla 9. Independientemente de si se utilizó el ion más cosmotrópico, sulfato, o el ión caotrópico, perclorato, el incremento de la temperatura de desnaturalización fue aproximadamente el mismo. De hecho, se obtuvo el mayor incremento de la T_m de rFSH para sales de iones perclorato, donde se espera un efecto desestabilizante sobre rFSH. El incremento de T_m estaba en el mismo intervalo tanto para una variedad de aniones inorgánicos como sulfato, cloruro y perclorato, como también para aniones orgánicos como citrato, acetato y tartrato.

Tabla 8: Temperatura de desnaturalización, T_m , en relación con la combinación del anión y catión de la sal para muestras de rFSH que contienen 2,4 mg/ml de rFSH, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico pH 6,5 y 0,1M de sal.

Anión	Cation				
	K ⁺	Na ⁺	NH ⁴⁺	Mg ²⁺	Zn ²⁺
SO ₄ ²⁻	77,6 °C	78,0 °C	74,9 °C	75,0 °C	60,2 °C
HPO ₄ ²⁻	77,9 °C				
Acetato		77,7 °C	76,2 °C		
Citrato		78,4 °C			
Tartrato		78,4 °C			
Cl ⁻	77,6 °C	77,7 °C		74,4 °C	59,9 °C
I ⁻	78,3 °C	78,7 °C	76,3 °C		57,5 °C
ClO ₄ ⁻		80,9 °C			

Sin sal añadida: T_m = 72,9 °C, otros excipientes de acuerdo con el encabezado de la tabla

0, 1 M de Sacarosa: T_m = 73,3 °C, otros excipientes de acuerdo con el encabezado de la tabla

5 **Tabla 9: Cambio en la temperatura de desnaturalización, ΔT_m (sal), en relación con la combinación del anión y catión de la sal para muestras de rFSH que contienen 2,4 mg/ml de rFSH, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico pH 6,5, tras la adición de 0,1 M de sal. Δ T_m (sal) = T_m (sal) - T_m**

(sin sal).

Anión	Cation				
	K ⁺	Na ⁺	NH ⁴⁺	Mg ²⁺	Zn ²⁺
SO ₄ ²⁻	4,7 °C	5,1 °C	2,1 °C	2,1 °C	-12,7 °C
HPO ₄ ²⁻	5,0 °C				
Acetato	4,8 °C	3,3 °C			
Citrato		5,5 °C			
Tartrato		5,5 °C			
Cl ⁻	4,7 °C	4,8 °C		1,5 °C	-13,0 °C
I ⁻	5,5 °C	5,8 °C	3,4 °C		-15,4 °C
ClO ₄ ⁻		8,0 °C			

0, 1 M Sacarosa: 0,4 °C, otros excipientes de acuerdo con el encabezado de la tabla

10 La tendencia observada, que la posición de los aniones en la serie de Hofmeister no afecta al incremento de la T_m de rFSH tras la adición de diferentes sales sódicas, también se encuentra para potasio (ver Tabla 8 y Tabla 9). Teniendo el mismo catión, el anión generalmente solamente influye en el cambio en la T_m de rFSH en un grado menor y nunca de acuerdo con la serie de Hofmeister.

15 De manera bastante sorprendente, los cationes, por el contrario, influyen sobre la T_m de rFSH. Más específicamente, sales con catión monovalente en general muestran una mayor T_m de rFSH que iones divalentes (ver Tabla 8). Especialmente, los iones monovalentes de metales alcalinos dan lugar a una alta T_m de rFSH. En otras palabras, los efectos estabilizantes observados (es decir, el aumento de la T_m de rFSH) tras la adición de sal es bastante independiente de los aniones ensayados (ver Tablas 8 y 9), mientras que los cationes tienen una gran influencia sobre el grado de estabilización. Las sales potásicas y sódicas muestran un gran efecto particularmente estabilizante.

20 Todas las soluciones anteriores ensayadas tienen una concentración de sal de 0,1 M. Para investigar el efecto de la concentración de sal sobre la T_m de rFSH, se investigaron mediciones DSC de soluciones de rFSH que contienen tres concentraciones diferentes de cloruro sódico. El efecto estabilizantes tras la adición de sal a una solución de rFSH se observa en todo el intervalo de concentración de sal ensayada (ver Tabla 10).

Tabla 10: Cambio en la temperatura de desnaturalización, ΔT_m (sal), para muestras de rFSH que contienen 2,4 mg/ml de rFSH, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico de pH 6,5, tras la adición de diferentes concentraciones de cloruro sódico. Δ T_m (sal) = T_m (sal) - T_m (sin sal).

Concentración de NaCl	ΔT _m (sal)
0,07 M	4,2 °C**
0,1 M	4,8 °C*
0,24 M	5,4 °C**

25 * Calculado a partir de mediciones DSC realizadas con una velocidad de barrido de 1,0 °C/min.

** Calculado a partir de mediciones DSC realizadas con una velocidad de barrido de 2,0 °C/min.

Patentes existentes sobre formulaciones de FSH utilizan por ejemplo sacarosa como estabilizantes para FSH. La adición de 0,1 M de sacarosa a una solución de rFSH produce un cambio ínfimo en la T_m de rFSH (ver Tabla 8 y Tabla

9), indicando que el efecto estabilizante de rFSH tras la adición de sales potásicas o sódicas es notablemente mayor que el efecto obtenido tras la adición de sacarosa.

Efecto de la Adición de Diversas Sales a Soluciones con Conservante añadido sobre T_m de rFSH

5 Es bien conocido que la adición de conservantes a soluciones de proteínas disminuyen la estabilidad de la proteína en solución. Sin embargo, para una formulación multidosis acuosa destinada para uso parenteral, es un requisito un conservante. Por lo tanto es de gran importancia compensar la disminución de la estabilidad de la proteína tras la adición de conservante mediante la adición de estabilizantes, como sales, a las soluciones de rFSH.

10 **Tabla 11: Temperatura de desnaturalización, T_m , y cambios en la temperatura de desnaturalización, ΔT_m (conservante) y ΔT_m (sal) para muestras de rFSH que contienen 2,4 mg/ml de rFSH, 5 mg/ml de fenol, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico pH 6,5 y 0,1 M de sal como indicado en la tabla. Aquí ΔT_m (conservante) = T_m (conservante) - T_m (sin conservante) y ΔT_m (sal) = T_m (sal) - T_m (sin sal).**

	T_m	ΔT_m (conservante)	ΔT_m (sal)*
Sin sal	70,2 °C	-2,7 °C	-
Na ₂ SO ₄	75,1 °C	-2,9 °C	4,9 °C
NaCl	74,7 °C	-2,9 °C	4,6 °C
NaClO ₄	78,6 °C	-2,3 °C	8,4 °C

* Para soluciones de rFSH que contienen 5 mg/ml de fenol

15 Como se puede ver en la Tabla 11, adicionar un conservante a una solución de rFSH resulta en una disminución de la temperatura de desnaturalización de rFSH en 2-3 °C.

20 La adición de sal a soluciones de rFSH conservadas incrementa la temperatura de desnaturalización de rFSH en alrededor de 5 °C. En otras palabras, el efecto desestabilizante observado tras la adición de un conservante a una solución de rFSH se compensa bien mediante la adición de una sal como definida por la invención. De hecho, la adición de sal a soluciones de rFSH que contienen fenol no solamente neutraliza el efecto del conservante sobre la T_m de rFSH, sino que de hecho incrementa la T_m en comparación con rFSH en solución acuosa sin adición de conservante o sal (ver Tabla 11).

EFEECTO DE ALTERAR EL pH SOBRE T_m de rFSH

25 Para estudiar el efecto del pH sobre la T_m de rFSH con y sin la adición de sales estabilizantes, se determinó la temperatura de desnaturalización de rFSH a un pH de 5,5, 6,5 y 7,5 con y sin la adición de tres sales sódicas diferentes (ver Tabla 12).

Tabla 12: Temperatura de desnaturalización, T_m , a diferentes pHs para muestras de rFSH que contienen 2,4 mg/ml de rFSH, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico y 0,1 M de sal. Aquí ΔT_m (sal) = T_m (sal) - T_m (sin sal)

	T_m			ΔT_m (sal)		
	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5
Sin sal	70,5 °C	72,9 °C	74,9 °C	-	-	-
Na ₂ SO ₄	76,2 °C	78,0 °C	78,7 °C	5,7 °C	5,1 °C	3,8 °C
NaCl	75,0 °C	77,7 °C	78,6 °C	4,5 °C	4,8 °C	3,7 °C
NaClO ₄	78,6 °C	80,9 °C	81,7 °C	8,1 °C	8,0 °C	6,7 °C

30 Como se puede ver en la Tabla 12, las tendencias generales en la T_m de rFSH tras la adición de diferentes sales sódicas es la misma en todo el intervalo de pH 5,5 hasta 7,5, es decir, la desviación del efecto estabilizante/desestabilizante de sales de acuerdo con la serie de Hofmeister se observa en todos los pH ensayados.

En el intervalo de pH investigado, las temperaturas de desnaturalización de rFSH observadas se incrementan con pH en incremento en las soluciones, tanto con como sin adición de sal (ver Tabla 12). El incremento real de la temperatura de desnaturalización de rFSH tras la adición de sales, ΔT_m (sal), es ligeramente inferior al pH más alto (ver Tabla 12).

35 **EFEECTO DE LA SIALILACIÓN DE rFSH SOBRE T_m de rFSH**

Como se ha demostrado anteriormente, la influencia de la adición de sales a una solución de rFSH no sigue en absoluto la serie de Hofmeister anteriormente descrita, donde se espera que sales de iones perclorato desestabilicen las proteínas (proporcionen una T_m de proteína inferior) y se espera que los iones sulfato estabilicen proteínas (proporcionen una T_m de proteína superior).

Dado que rFSH es una proteína glicosilada, que tiene numerosos residuos de ácido siálico unidos a las unidades de azúcar, y por lo tanto una carga neta negativa bastante elevada, se investigó el efecto del ácido siálico sobre el inesperado comportamiento de estabilización de las sales.

5 Para estudiar el efecto del ácido siálico sobre T_m de rFSH tras la adición de diferentes sales, se eliminó enzimáticamente el ácido siálico. Se analizó entonces la rFSH desialilada mediante DSC, con y sin adición de sal.

Para verificar que los residuos de ácido siálico se eliminaron con éxito, se analizó la muestra de rFSH antes y después de la eliminación enzimática del ácido siálico mediante MALDI-ToF MS.

Bajo condiciones ácidas de la muestra MALDI-TOF MS, las subunidades alfa y beta se disocian y por lo tanto se miden por separado. El peso molecular promedio de la subunidad alfa antes del tratamiento con sialidasa es 15000 Da.

10 Después del tratamiento con sialidasa el peso molecular promedio es de 14000 Da.

El peso molecular promedio de la subunidad beta antes del tratamiento con sialidasa es 18000 Da, y 17000 Da después del tratamiento con sialidasa. El cambio en la masa de ambas subunidades es un resultado de la eliminación de ácidos siálicos que se traduce en reducción de la masa. Prácticamente todos los residuos de ácido siálico se eliminaron de la rFSH durante la desialilación.

15 El incremento de la T_m de rFSH tras la adición de sulfato sódico o perclorato sódico sigue la misma tendencia para rFSH sin modificar y rFSH desialilada, es decir, el efecto estabilizante (incremento de T_m de rFSH) observado no sigue la serie de Hofmeister anteriormente descrita. En general, la T_m observada es 2-6 °C inferior para rFSH desialilada que para rFSH no modificada (ver Tabla 13). El efecto estabilizante observado tras la adición de sal también es inferior para rFSH desialilada que para rFSH no modificada (ver Tabla 13).

20 Se espera la T_m inferior obtenida para rFSH desialilada que para rFSH no modificada, ya que se cree que la presencia de ácido siálico en las unidades de azúcar en la rFSH aumenta la estabilidad de rFSH.

El hecho de que tanto la rFSH sin modificar como rFSH desialilado siguen la misma tendencia (desviándose del efecto estabilizante/ desestabilizante de acuerdo con la serie de Hofmeister) tras la adición de diversas sales, demuestra que no es la presencia de ácidos siálicos en la rFSH per se que da lugar a este efecto.

25 **Tabla 13: Temperatura de desnaturalización, T_m , para muestras de rFSH desialilada que contienen 2,4 mg/ml de rFSH o 2,4 mg/ml de rFSH desialilada, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico pH 6,5 y 0,1 M de sal. Aquí, $\Delta T_m (sal) = T_m (sal) - T_m (sin sal)$.**

	T_m		$\Delta T_m (sal)$	
	rFSH	rFSH desialilada	rFSH	rFSH desialilada
Sin sal	72,9°C	70,7°C	-	-
Na ₂ SO ₄	78,0°C	72,1°C	5,1°C	1,5°C
NaClO ₄	80,9°C	75,0°C	8,0°C	4,4°C

CONCLUSIONES

30 El efecto desestabilizante (disminución de la T_m de rFSH) observado para rFSH tras la adición de conservante se corresponde bien con los conocimientos del estado de la técnica dentro del área.

35 Sin embargo, la desviación de la serie de Hofmeister observada en la temperatura de desnaturalización de rFSH tras la adición de sales con diferentes aniones, es inesperada. De acuerdo con la serie de Hofmeister, (que clasifica sales de acuerdo con sus efectos generales sobre solubilidad y estabilidad de la proteína), aniones cosmotrópicos tales como sulfato normalmente estabilizan proteínas (proporcionan una mayor T_m), mientras que aniones caotrópicos tales como perclorato desestabilizan proteínas (proporcionan una menor T_m). En este estudio, todos los aniones ensayados que tienen el mismo catión, muestran un incremento similar en la temperatura de desnaturalización de rFSH. De manera bastante opuesta a la predicción de la serie de Hofmeister, sales de iones perclorato muestran el máximo aumento de temperatura de desnaturalización de rFSH.

40 En otras palabras, el efecto estabilizante observado (es decir, el incremento de la T_m de rFSH) tras la adición de sal es bastante independiente de los aniones ensayados.

Sales sódicas y potásicas muestran un gran efecto particularmente estabilizante. Especialmente la adición de perclorato sódico a una solución de rFSH da lugar a un gran incremento de la temperatura de desnaturalización de rFSH. Sin embargo, los percloratos generalmente son muy reactivos y son agentes oxidantes y por lo tanto percloratos no están aprobados como ingredientes inactivos en formulaciones farmacéuticas.

El efecto estabilizante inesperado obtenido para rFSH tras la adición de sales no se puede explicar mediante la presencia de ácido siálico en las unidades de azúcar de la rFSH. Las determinaciones de temperatura de desnaturalización de rFSH en rFSH desialilada muestran las mismas tendencias en el efecto estabilizante sobre rFSH tras la adición de sales que rFSH no modificada.

5 Ejemplo 3 - Estabilidad en tiempo real sobre soluciones rFSH

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio era establecer si la estabilidad en tiempo real de rFSH en diversas formulaciones sigue la misma tendencia como vista en las mediciones de la temperatura de desnaturalización de rFSH por medio de DSC líquida como descrito en el Ejemplo 2 y también los cambios en la estructura secundaria de rFSH tras calentamiento, tal como medido con espectroscopia de DC, como descrito en el Ejemplo 1.

En este estudio se determina la estabilidad estructural de la rFSH durante almacenamiento, medida como cuán propensa es rFSH a disociarse en sus monómeros.

Se estudió la estabilidad de formulaciones de 600 UI/ml de rFSH después de almacenamiento a dos temperaturas diferentes de almacenamiento en condiciones de 5 ± 3 °C/HR ambiental a largo plazo y condiciones aceleradas de 30 ± 2 °C/65 \pm 5% HR durante 6-12 meses. Todos los viales se almacenaron en posición invertida. Controles de placebo que contienen las formulaciones correspondientes, pero sin rFSH añadida se almacenaron en las mismas condiciones que las descritas para rFSH activa.

PRODUCTOS A SER ESTUDIADOS

INFORMACIÓN DE LOTES

20 rFSH, sustancia farmacológica lote N° 08800060 y lote N° 09800020 fueron fabricados por Bio-Technology General (BTG), Israel.

La determinación de la actividad biológica de los lotes rFSH anteriores se realizó de acuerdo con Ph.Eur.

MATERIALES

Excipientes

25 En la Tabla 14 se describe un listado de los excipientes utilizados en este estudio.

Tabla 14: Listado de excipientes

Nombre	Proveedor
Hidrógeno Fosfato disódico dihidrato, Ph. Eur.	Merck
Ácido fosfórico al 85%, Ph. Eur.	Merck
Sacarosa, Ph. Eur.	Merck
Polisorbato (polisorbato) 20 Ph. Eur.	Merck
Fenol, Ph. Eur.	Merck
L-metionina, Ph. Eur.	Sigma
Cloruro sódico, Ph. Eur.	Merck
Sulfato disódico \times 10 H ₂ O, Ph.Eur.	Merck
Agua Milli-Q	Millipore

Sistema de Envase y Cierre

Los materiales de envasado primarios utilizados se enumeran en la Tabla 15.

Tabla 15: Sistema de Envase/Cierre

Elemento	Descripción	Proveedor
Envase	Viales incoloros de vidrio de borosilicato de Tipo 1 Ph. Eur., 2R	ISO-GmbH
Cierre de goma	Tope de clorobutilo de 13 mm 4432/50 B2-40 recubierto, FluoroTec	West Pharmaceutical Services
Tapa	Tapa de aluminio y tapa de plástico ("flip off")	West Pharmaceutical Services

La composición de las soluciones madre de rFSH y las diferentes formulaciones (rFSH y placebo) están listadas en la Tabla 16, Tabla 17 y Tabla 18. A excepción de la formulación que no contiene ningún estabilizante/agente de tonicidad, la concentración del estabilizante/agente de tonicidad se ajusta para proporcionar soluciones isotónicas.

Tabla 16: Composición de soluciones madre de rFSH

Lote	Concentración de rFSH	Vehículo
08800060	16235 UI/mg 0,7 mg/ml	0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20 en 1 mM de hidrógeno fosfato disódico pH 6,7-6,8
09800020	13223 UI/mg 0,7 mg/ml	0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20 en 1 mM de hidrógeno fosfato disódico pH 6,7-6,8

5

Tabla 17: Composición de las formulaciones de rFSH

rFSH	Tampón	Tensioactivo	Conservante	Antioxidante	Estabilizante/agente de tonicidad
600 UI/mg	20 mM Fosfato pH 6,5*	0,005 mg/ml Polisorbato 20	-	0,5 mg/ml de L-metionina	15 mg/ml Na ₂ SO ₄
600 UI/mg	1 mM Fosfato pH 6,5*	0,005 mg/ml Polisorbato 20	5 mg/ml Fenol	1 mg/ml de L-metionina	14 mg/ml Na ₂ SO ₄
600 UI/mg	1 mM Fosfato pH 6,5*	0,005 mg/ml Polisorbato 20	5 mg/ml Fenol	1 mg/ml de L-metionina	7 mg/ml NaCl
600 UI/mg	1 mM Fosfato pH 6,5*	0,005 mg/ml Polisorbato 20	5 mg/ml Fenol	1 mg/ml de L-metionina	75 mg/ml Sacarosa
600 UI/mg	1 mM Fosfato pH 6,5*	0,005 mg/ml Polisorbato 20	5 mg/ml Fenol	1 mg/ml de L-metionina	-

*El pH se refiere al pH de la solución final

10 **Tabla 18: Composición de formulaciones de placebo**

Tampón	Tensioactivo	Conservante	Antioxidante	Estabilizante/agente de tonicidad
20 mM Fosfato pH 6,5*	0,005 mg/ml de Polisorbato 20	-	0,5 mg/ml de L-metionina	15 mg/ml Na ₂ SO ₄
1 mM Fosfato pH 6,5*	0,005 mg/ml de Polisorbato	20 5 mg/ml de Fenol	1 mg/ml de L-metionina	14 mg/ml Na ₂ SO ₄
1 mM Fosfato pH 6,5*	0,005 mg/ml de Polisorbato	20 5 mg/ml de Fenol	1 mg/ml de L-metionina	7 mg/ml NaCl
1 mM Fosfato pH 6,5*	0,005 mg/ml de Polisorbato 20	5 mg/ml de Fenol	1 mg/ml de L-metionina	75 mg/ml Sacarosa
1 mM Fosfato pH 6,5*	0,005 mg/ml de Polisorbato	20 5 mg/ml deg Fenol	1 mg/ml de L-metionina	-

*El pH se refiere al pH de la solución final

PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN

Todas las soluciones (Tabla 17 y Tabla 18) se fabrican a escala de laboratorio en Ferring Pharmaceuticals A/S, Copenhagen, Dinamarca. El procedimiento de fabricación se resume a continuación.

Preparación de formulaciones de rFSH y de placebo

Se preparan soluciones madre de todos los excipientes en agua Milli-Q.

5 Para la preparación de soluciones de placebo, se mezclan soluciones madre de cada excipiente para obtener las concentraciones dadas en la Tabla 18. Antes de diluir a volumen, se ajusta el pH de cada formulación, cuando sea necesario.

Para la preparación de formulaciones de rFSH, se prepara una solución de dilución se prepara a partir de la solución madre de cada excipiente. Se ajusta el pH de las soluciones de dilución. Las soluciones de dilución se mezclan con la solución madre de rFSH (ver Tabla 16) para proporcionar las concentraciones finales enumeradas en la Tabla 17.

Filtración estéril y llenado aséptico

10 Las formulaciones finales son esterilizadas mediante filtración utilizando filtros PVDF de 0,22 µm (Millipore). Las formulaciones de placebo son esterilizadas mediante filtración estéril en frascos de vidrio tratados en autoclave utilizando filtros Stericup. Las formulaciones son filtradas de manera estéril en vasos de vidrio tratados en autoclave, utilizando filtros Sterivex-GV y jeringas estériles Luer Lock de 20 ml (Braun). La filtración estéril, llenado y sellado de los viales se lleva a cabo en una cabina de flujo laminar utilizando viales tratados en autoclave y toques de goma. Antes y después del llenado, los viales se purgan con gas nitrógeno, pasando a través de un filtro Millex-FG PTFE de 0,20 µm (Millipore) durante al menos 6 segundos. Los viales se llenan con 1,5 ml de la muestra por vial. Todos los viales se llenan de manera aséptica e inmediatamente se cierran con toques de goma y tapas de aluminio "flip-off".

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

20 Las muestras que contienen 600 UI/ml de rFSH y placebo se almacenan durante 6-18 meses a 5 ± 3 °C/ HR ambiental. Además, las muestras se almacenan durante 6-18 meses en condiciones aceleradas, 30 ± 2 °C/65 ± 5% HR. A cada temperatura de almacenamiento, los viales se almacenan en posiciones invertidas. Todos los viales se protegen de la luz.

PROGRAMAS DE ESTABILIDAD

Los programas de estabilidad para 600 UI/ml de rFSH y placebo se muestran a continuación en la Tabla 19.

25 **Tabla 19: Programa de estabilidad para formulación líquida de 600 UI/ml de rFSH y placebo, almacenada en posición invertida**

Condición de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento (meses)					
	0	1	3	6	12*	18*
5 ± 3 °C/ HR ambiental	X	-	-	X	X	X
30 ± 2°C/ HR ambiental	X	X	X	X	X	X

- Sin ensayo programado de acuerdo con el programa de estabilidad

* Solamente ensayado para algunas formulaciones

MÉTODOS ANALÍTICOS

30 El método analítico utilizado en este estudio se describe a continuación. En cada sesión de ensayo, se van a analizar 2 viales de rFSH y 1 vial del placebo correspondiente para cada formulación.

FORMAS DE BAJO PESO MOLECULAR (BPM)

35 Las formas de BPM de rFSH se determinan mediante por LC-UV (cromatografía líquida con detección UV) utilizando elución isocrática en una columna de exclusión por tamaño (SEC). El análisis se lleva a cabo utilizando una columna a base de sílice con tampón TRIS como fase móvil y detección UV. Las formas de BPM de rFSH son los picos que eluyen con un peso molecular inferior (después) que el del pico principal de rFSH. Las formas de BPM se determinan como porcentaje del área del pico del área total del pico.

Para muestras que contienen conservante, el conservante se elimina de la solución de muestra antes de entrar en la columna de exclusión por tamaño.

40 **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

DISOCIACIÓN DE rFSH DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Debido a que rFSH pierde su bioactividad tras la disociación de los monómeros acoplados de manera no covalente, una manera directa de seguir la pérdida de actividad de rFSH debido a la disociación monomérica es medir la cantidad de forma de BPM de rFSH en solución. Esta información se puede recuperar a partir de cromatografía SEC, donde se sabe que el pico de las formas de BPM que eluyen después del pico principal de rFSH proceden de la rFSH disociada.

- 5 **Tabla 20: La cantidad relativa de formas LMW de rFSH (%) como determinado mediante SEC después de almacenamiento a 30 ± 2 °C/ 65 ± 5 % HR. La descripción completa de todas las formulaciones se enumera en la Tabla 17.**

Estabilizante	Conservante	Tiempo de almacenamiento (meses)					
		0	1	3	6	12	18
15 mg/ml Na ₂ SO ₄	-	1,5	2,5	1,7	2,4	3,0	2,7
14 mg/ml Na ₂ SO ₄	5 mg/ml de fenol	1,7	3,5	3,1	3,9	6,5	6,0
7 mg/ml NaCl	5 mg/ml de fenol	1,8	1,7	3,1	3,1	4,4	N.R.
75 mg/ml de sacarosa	5 mg/ml de fenol	1,9	6,2	7,3	10,1	N.R.	N.R.
-	5 mg/ml de fenol	2,0	7,7	16,9	23,4	32,2	N.R.

N.R. No realizado.

- 10 **Tabla 21: La cantidad relativa de formas LMW de rFSH (%) como determinado mediante SEC después de almacenamiento a 5 ± 3 °C/HR ambiental. La descripción completa de todas las formulaciones se enumera en la Tabla 17.**

Estabilizante	Conservante	Tiempo de almacenamiento (meses)			
		0	6	12	18
15 mg/ml Na ₂ SO ₄	-	1,5	1,5	1,0	0,8
14 mg/ml Na ₂ SO ₄	5 mg/ml de fenol	1,7	2,0	1,6	1,3
7 mg/ml NaCl	5 mg/ml de fenol	1,8	1,1	1,3	N.R.
75 mg/ml de sacarosa	5 mg/ml de fenol	1,9	1,9	N.R.	N.R.
-	5 mg/ml de fenol	2,0	1,1	1,7	N.R.

N.R. No realizado.

- 15 Como se puede ver en la Tabla 20, solución de rFSH recién preparada que contiene diferente estabilizante, con y sin conservante añadido, muestra una cantidad relativa similar de rFSH disociada (formas de BPM). Dado que el límite de cuantificación del método SEC es 3% no se puede llevar a cabo una diferenciación inequívoca entre las formulaciones por debajo de este límite, lo que significa que las diferencias observadas en las formas de BPM en el punto temporal inicial están dentro de los límites de la variación del método.

- 20 Ya después de un almacenamiento durante un mes a 30 ± 2 °C/ 65 ± 5 % HR, la cantidad relativa de rFSH disociada ha aumentado para muestras que contienen fenol junto con sacarosa o ningún estabilizante, mientras que las muestras que contienen sulfato sódico o cloruro sódico no mostraron ningún incremento significativo de rFSH disociada (ver Tabla 20).

- 25 Después de un almacenamiento durante seis meses a 30 ± 2 °C/ 65 ± 5 % HR, la muestra de rFSH que contiene fenol sin estabilizante añadido contiene más del 20% de rFSH disociada (formas de BPM). Las muestras de rFSH que contienen fenol y que tienen sacarosa como estabilizante también muestran un marcado incremento de rFSH disociada (más del 10% de rFSH disociada), mientras que las muestras que contienen fenol, estabilizadas con cualquiera de cloruro sódico o sulfato sódico muestran solamente un aumento ínfimo en rFSH disociada (ver Tabla 20). Muestras que no contienen ningún conservante son las más estables frente a disociación durante el almacenamiento; sin embargo, para una formulación acuosa multidosis destinada a uso parenteral, se requiere la adición de un conservante, por lo tanto esta formulación se añade únicamente como una comparación.

- 30 Después de un almacenamiento durante seis meses a 5 ± 3 °C/RH ambiental, ninguna de las formulaciones ensayadas de rFSH revela un incremento en la cantidad relativa de rFSH disociada (ver Tabla 21). Aunque para que un producto

comercial de rFSH tenga éxito, es necesario un almacenamiento durante al menos 24 meses a 5 °C y un mes concomitante, preferiblemente un almacenamiento durante 3-4 meses a temperatura ambiente.

TEMPERATURA DE DESNATURALIZACIÓN DE rFSH, CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA SCUNDARIA Y GRADO DE DISOCIACIÓN

- 5 Puesto que el objetivo de este ejemplo era determinar la correlación entre los datos experimentales de estabilidad en tiempo real, las determinaciones de la temperatura de desnaturalización de rFSH mediante DSC y datos de la estructura secundaria de rFSH determinada mediante espectroscopía DC, parte de los datos de DSC (ver el Ejemplo 2) y parte de la datos de DC (ver el Ejemplo 1) se presentan a continuación. Todos los detalles sobre los resultados de DSC presentados se dan en el Ejemplo 2 y los detalles sobre los datos de DC se dan en el Ejemplo 1.
- 10 **Tabla 22: La cantidad relativa de formas BPM de rFSH (%) como determinado mediante SEC después de 6 meses de almacenamiento a 30 ± 2 °C/ $65 \pm 5\%$ HR y la temperatura de desnaturalización de rFSH, T_m , como determinado mediante DSC. En el estudio de DSC la concentración de los estabilizantes se mantiene a 0,1 M para todas las soluciones ensayadas, en comparación con la cantidad utilizada en el estudio de estabilidad en tiempo real dado en la tabla.**

Estabilizante	Conservante	SEC, BPM 6 meses a 30 ± 2 °C/ $65 \pm 5\%$ HR	DSC T_m
15 mg/ml Na ₂ SO ₄	-	2,3	78,0°C
14 mg/ml Na ₂ SO ₄	5 mg/ml de fenol	3,9	75,1°C
7 mg/ml NaCl	5 mg/ml de fenol	3,1	74,7°C
75 mg/ml de sacarosa	5 mg/ml de fenol	10,1	-
-	5 mg/ml de fenol	23,4	70,2°C

- 15 Como se puede ver en la Tabla 22, la temperatura de desnaturalización de rFSH obtenida mediante DSC se correlaciona bien con los datos de estabilidad en tiempo real después de almacenamiento durante seis meses a 30 ± 2 °C/ $65 \pm 5\%$ HR, se ha presentado previamente una correlación similar entre DSC y la estabilidad en tiempo real como analizado mediante SEC para anticuerpos recombinantes y glicoproteínas recombinantes (ver por ejemplo *Burton et al (2007), Pharm. Dev. Technol. 12:265-273* y *Remmele et al (1998), Pharm. Res. 15:200-208*). La solución de rFSH sin conservante añadido estabilizada con sulfato sódico muestra solamente un bajo grado de rFSH disociada después de almacenamiento durante seis meses, muestra una temperatura de desnaturalización significativamente mayor que soluciones que contienen un conservante. Se puede además ver que para soluciones que contienen un conservante (fenol) de una sal, la adición de una sal, cualquiera de cloruro sódico o sulfato sódico, proporciona un grado significativamente menor de rFSH disociada después de un almacenamiento durante seis meses, que soluciones que contienen sacarosa o ningún estabilizante. La temperatura de desnaturalización de rFSH sin estabilizante añadido también es significativamente más baja que la T_m de rFSH para soluciones que contienen sal. No se ha determinado la temperatura de desnaturalización de rFSH para soluciones que contienen sacarosa con adición de fenol, sin embargo, como se puede ver en la Tabla 23, las mediciones de la T_m de rFSH para soluciones sin conservante añadido, muestra la misma tendencia que los datos de estabilidad en tiempo real después de un almacenamiento durante seis meses a 30 ± 2 °C/ $65 \pm 5\%$ HR (ver Tabla 22). En conclusión, NaCl y Na₂SO₄ son estabilizantes significativamente mejores que sacarosa frente a degradación estructural. Esto se demuestra tanto mediante las mediciones de T_m (ver Tabla 23) como mediante datos de estabilidad en tiempo real (ver Tabla 22).

Tabla 23: La temperatura de desnaturalización de rFSH, T_m , para soluciones sin conservantes añadidos determinada mediante DSC; para más detalles ver el Ejemplo 2.

Estabilizante	DSC, T_m
0,1M Na ₂ SO ₄	78,0°C
0,1 M NaCl	77,7°C
0,1 M de Sacarosa	73,3°C

- 35 **Tabla 24: Cambio en la temperatura de desnaturalización, ΔT_m para muestras de rFSH que contienen 2,4 mg/ml de rFSH, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico pH 6,5, cuando se adiciona conservante o sal como listado en la tabla. Velocidad de barrido 2°C/min. $\Delta T_m = T_m$ (conservante/sal) - T_m (sin adición)**

Conservante	Sal	ΔT_m
15 mg/ml de alcohol bencílico	Sin sal	-4,7°C
15 mg/ml de alcohol bencílico	0,1 M de Na ₂ SO ₄	-1,6°C
Sin conservante	0,1 M de Na ₂ SO ₄	+4,1°C
Sin conservante	Sin sal	0°C

No se han determinado datos de estabilidad en tiempo real para soluciones que contienen alcohol bencílico como conservante, sin embargo, cuando se compara la temperatura de desnaturalización de rFSH como determinada mediante DSC y los cambios en la estructura secundaria de rFSH tras calentamiento como determinados mediante espectroscopia de DC, se observa la misma tendencia (ver Tabla 24). Se ha determinado la estructura secundaria de rFSH para diferentes muestras de proteínas; la estructura secundaria determinada a 24 °C se puede considerar como la estructura nativa, y aquí no se pueden observar diferencias en la estructura secundaria de rFSH para soluciones de rFSH tras la adición de alcohol bencílico (a 0,17 mg/ml) o sulfato sódico.

Sin embargo, cuando se calientan las soluciones hasta 76,5 °C, la pérdida observada en la estructura secundaria de rFSH varía con los excipientes añadidos. La adición de conservante (alcohol bencílico) da lugar a una mayor pérdida de estructura secundaria de rFSH que para soluciones de rFSH que no contienen ningún conservante, mientras que la adición de sal (sulfato sódico) produce una menor pérdida de estructura secundaria de rFSH que para soluciones de rFSH sin sal añadida. Una pérdida de estructura secundaria ordenada de rFSH se puede interpretar como una desnaturalización parcial o total de la proteína.

Ejemplo 4 - Datos de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para hCG

La Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) es una proteína heterodimérica que consiste en dos monómeros glicosilados: una subunidad α que es común para hCG, Hormona Folículo Estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH), y Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH), y una subunidad β que es específica para hCG. Las hormonas de glicoproteína, que comprenden FSH y hCG, todas pierden su bioactividad tras la disociación de los monómeros acoplados de forma no covalente. Resultados de análisis de estabilidad han indicado que la inestabilidad de FSH recombinante (rFSH) se basa principalmente en la disociación dimérica (descomposición de la estructura cuaternaria, y disminución concomitante en la respuesta de unión inmune).

El objetivo de este ejemplo es establecer si la dependencia previamente observada de diversos azúcares y sales sobre la temperatura de desnaturalización de rFSH, como determinada mediante DSC y como descrita en los ejemplos 1 - 3 anteriores, se observa también para la proteína hCG, muy similar. Adicionalmente, la temperatura de desnaturalización por DSC para hCG determinada en este estudio es comparable con datos de estabilidad en tiempo real previamente publicados (Samaritani, F. 1995, hCG liquid formulations. EP 0 814, 841).

Se estudió la temperatura de desnaturalización de hCG en la presencia y ausencia de 0,1 M de diversas sales sódicas o sacarosa en un 1 mM de tampón fosfato que contiene 0,5 mg/ml de L-metionina y 0,005 mg/ml de polisorbato 20. Se investigan cuatro azúcares y sales diferentes; sacarosa, sulfato sódico, cloruro sódico y perclorato sódico.

Gonadotropina Coriónica humana (hCG) derivada de orina

Se utilizó hCG, sustancia farmacológica, lote no. 2823287510 (7059 UI/mg) como purificada a partir de orina humana de Massone S.A., Argentina. El material se almacenó refrigerado a 2-8 °C.

La determinación de la actividad biológica del lote de hCG anterior se realizó de acuerdo con Ph.Eur.

La rFSH y otros materiales se utilizaron tal como se describe en los Ejemplos 2-3.

Tabla 25: Listado de excipientes

Nombre	Proveedor
Hidrógeno fosfato disódico dihidrato, Ph. Eur.	Merck
Ácido fosfórico al 85%, Ph. Eur.	Merck
L-metionina, Ph. Eur.	Sigma
Polisorbato (Tween) 20 Ph. Eur.	Merck
Sacarosa, Ph. Eur.	Merck
Sulfato sódico \times 10 H ₂ O, Ph.Eur.	Merck
Cloruro sódico, Ph. Eur.	Merck
Perclorato Acetato sódico \times H ₂ O, p.a.	Merck
Agua Milli-Q	Millipore

La composición de las diferentes formulaciones de hCG se enumeran en la Tabla 26.

Tabla 26: Composición de formulaciones de hCG

hCG	Tampón	Tensioactivo	Antioxidante	Azúcar/sal
5 mg/ml*	Fosfato 1 mM pH 6,5	0,005 mg/ml de Polisorbato 20	0,5 mg/ml de L- metionina	0,1 M de Na ₂ SO ₄
5 mg/ml*	Fosfato 1 mM pH 6,5	0,005 mg/ml de Polisorbato 20	0,5 mg/ml de L- metionina	0,1 M NaCl
5 mg/ml*	Fosfato 1 mM pH 6,5	0,005 mg/ml de Polisorbato 20	0,5 mg/ml de L- metionina	0,1 M NaClO ₄
5 mg/ml*	Fosfato 1 mM pH 6,5	0,005 mg/ml de Polisorbato 20	0,5 mg/ml de L- metionina	0,1 M de Sacarosa
5 mg/ml*	Fosfato 1 mM pH 6,5	0,005 mg/ml de Polisorbato 20	0,5 mg/ml de L- metionina	-

* Corresponde a 35 300 UI/ml para este lote.

PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN

5 Todas las soluciones (Tabla 26) se fabrican a escala de laboratorio en Ferring Pharmaceuticals A/S, Copenhague, Dinamarca.

Preparación de formulaciones de hCG

Se preparan soluciones madre de todos los excipientes en agua Milli-Q. Se preparan soluciones de placebo con los diversos excipientes a partir de la solución madre.

10 La sustancia farmacológica hCG se disuelve en las soluciones de placebo para obtener las concentraciones dadas en la Tabla 26. Dado que los datos de estabilidad de estas formulaciones no estaban disponibles, los análisis de DSC siempre se realizan en muestras recién preparadas; dentro del plazo de una hora desde la preparación de la muestra.

15 Como se puede ver en la Figura 4 y la Tabla 27, la temperatura de desnaturalización, T_m , para hCG es inferior que la T_m para rFSH. Además, la entalpía del proceso de desnaturalización (es decir, el tamaño del pico de desnaturalización) es notablemente inferior para hCG que para rFSH. A diferencia de rFSH, donde el proceso de desnaturalización es casi completamente irreversible después de calentar muestras de rFSH hasta 100 °C, el proceso de desnaturalización después de calentar hCG hasta 100 °C es, en mayor medida, reversible (2).

Nativa ↔ Desplegada → Desnaturalizada de Manera Irreversible (2)

20 Una explicación para el hecho de que el proceso de hCG desnaturalización sea, en gran medida, reversible en el marco temporal de las mediciones DSC, mientras que esto no es cierto para la rFSH, podría ser si las dos subunidades en hCG son menos propensas a disociarse que en rFSH. Si las subunidades no se disocian mientras se calientan las muestras de hCG, se podría volver a formarse nuevamente más fácilmente la estructura nativa tras enfriarse hasta temperatura ambiente. La magnitud de ΔH para la transición tras el calentamiento hasta 100 °C es notablemente mayor para rFSH que para hCG, mientras que la magnitud de ΔH para la transición en un barrido concomitante (es decir, calentando la muestra hasta 100 °C, enfriando hasta 25 °C y realizando un segundo barrido a 100 °C) está en el mismo rango de tamaño para rFSH y hCG.

EFECTO DE LA ADICIÓN DE AZÚCAR O SAL SOBRE LA T_m DE hCG Y rFSH

Se espera que la adición de sal a soluciones acuosas de proteínas influya sobre la estabilidad de la proteína en solución y por lo tanto afecte a la temperatura de desnaturalización de la proteína.

30 Cuando se mide el efecto de diversas sales sódicas sobre la T_m de hCG y rFSH, de manera bastante sorprendente, no se observó el efecto estabilizante/desestabilizante esperado de acuerdo con la serie de Hofmeister cuando se varían los aniones, ver la Figura 5, Figura 6 y Tabla 27. Para hCG tanto sulfato sódico como cloruro sódico en realidad desestabilizan la proteína, mientras que para rFSH estas sales estabilizan la proteína. Tanto para hCG como para rFSH, el perclorato sódico, el cual se espera que tenga un efecto desestabilizante sobre proteínas, en realidad es el que más aumentó la T_m de todos los azúcares y sales ensayados.

35 Tabla 27: Temperatura de desnaturalización, T_m , y cambio en la temperatura de desnaturalización, ΔT_m (azúcar/sal), para muestras de hCG que contienen 5 mg/ml de hCG, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico de pH 6,5, tras la adición de 0,1 M de azúcar o sal, y muestras de rFSH que contienen 2,4 mg/ml de rFSH, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico de pH 6,5, tras la adición de 0,1 M de azúcar o sal. ΔT_m (azúcar/sal) = T_m (azúcar/sal) - T_m (sin azúcar/sal).

40

Azúcar/sal	hCG		rFSH	
	T _m	Δ T _m	T _m	Δ T _m
Sin azúcar o sal	72,1°C	-	72,9°C	-
Na ₂ SO ₄	69,8°C	-2,3°C	78,0°C	5,1°C
NaCl	69,3°C	-2,7°C	77,7°C	4,8°C
NaClO ₄	75,0°C	2,9°C	80,9°C	8,0°C
Sacarosa	72,4°C	0,3°C	73,3°C	0,4°C

EFECTO DE LA ADICIÓN DE AZÚCAR O SAL SOBRE LA PUREZA DE hCG Y rFSH

Disociación de Subunidades de rFSH, Pureza de rFSH Durante el Almacenamiento

Debido a que rFSH pierde su bioactividad tras la disociación de los monómeros acoplados de manera no covalente, una manera directa de seguir la pérdida de actividad de rFSH debido a la disociación monomérica es medir la cantidad de forma de BPM de rFSH en solución. Esta información se puede recuperar a partir de cromatografía SEC, donde se sabe que las formas de BPM que eluyen después del pico principal de rFSH proceden de rFSH disociada.

En la formulación estudiada, no se observan otros compuestos relacionados con proteínas, tales como agregados de rFSH. Por lo tanto, la pureza de proteína de rFSH se puede calcular como

$$\text{Pureza (\%)} = 100\% - \text{formas BPM (\%)} \quad (4)$$

10 Tabla 28: La pureza de rFSH como determinada mediante SEC después de almacenamiento a 30 ± 2 °C/65 ± 5% HR.

Azúcar/sal	Conservante	Tiempo de almacenamiento (meses)				
		0	1	3	6	12
15 mg/ml Na ₂ SO ₄	-	98,5%	97,5%	98,3%	97,7%	97,0%
14 mg/ml Na ₂ SO ₄	5 mg/ml de fenol	98,3%	96,5%	96,9%	96,1%	93,5%
7 mg/ml NaCl	5 mg/ml de fenol	98,2%	98,3%	96,9%	96,9%	95,6%
75 mg/ml de sacarosa	5 mg/ml de fenol	98,1%	93,8%	92,7%	89,9%	-
-	5 mg/ml de fenol	98,0%	92,3%	83,1%	76,6%	67,8%

Como se puede ver en la Tabla 28, soluciones de rFSH recién preparadas que contienen diferentes azúcares o sales, con y sin conservante añadido, muestran una pureza similar, eso es, cantidades relativas similares de rFSH disociada (formas de BPM).

15 Ya después de un mes de almacenamiento a 30 °C, la pureza de rFSH disminuye para muestras que contienen fenol junto con sacarosa o ningún azúcar o sal, mientras que muestras que contienen fenol y sulfato sódico o cloruro sódico junto con muestras sin fenol añadido, no mostraron ninguna disminución significativa en la pureza de rFSH (ver Tabla 28). Después de un almacenamiento durante seis meses a 30 °C, las muestras de rFSH que contienen fenol sin azúcar o sal añadidos producen una pureza de rFSH de menos del 80%. Las muestras de rFSH que contienen fenol y que tienen sacarosa como estabilizante también muestran una marcada disminución en la pureza de rFSH, mientras que 20 muestras que contienen fenol, estabilizadas con cualquiera de cloruro sódico o sulfato sódico muestran solamente una disminución ínfima en la pureza de rFSH (ver Tabla 28). Muestras que no contienen ningún conservante son las más estables frente a disociación durante el almacenamiento, es decir, muestran la pureza más alta, sin embargo, para una formulación multidosis acuosa destinada para uso parenteral, se requiere la adición de un conservante.

Pureza de hCG Durante el Almacenamiento

25 Datos previamente publicados sobre los cambios en la pureza de hCG durante el almacenamiento se utilizan como comparación con los datos de estabilidad de rFSH presentados anteriormente (Samaritani, supra).

Ya después de un almacenamiento durante un mes a 50 °C, la pureza hCG disminuye notablemente.

La disminución es significativamente mayor para muestras que contienen cloruro sódico que para muestras que contienen sacarosa (véase la Tabla 29). Después de un almacenamiento durante seis semanas a 50 °C, la pureza de hCG de muestras que contienen cloruro sódico es más del 10% inferior que para muestras que contienen sacarosa. 30

Tabla 29: La pureza de hCG (%) como determinada mediante SEC después de almacenamiento a 50 °C. La descripción completa de las formulaciones se enumera en la página 11 de la patente EP 0814841.

Azúcar/sal	Conservante	Tiempo de almacenamiento (semanas)			
		0	1	2	6
7 mg/ml NaCl	5 mg/ml de fenol	100%	89,7%	85,6%	71,7%
75 mg/ml de sacarosa	5 mg/ml de fenol	100%	94,1%	90,3%	83,0%

COMPARACIÓN DE T_m Y PUREZA DE hCG Y rFSH

5 Como se puede ver en la Tabla 30, tanto la temperatura de desnaturalización de rFSH como la de hCG obtenidas mediante DSC se correlacionan bien con la pureza de rFSH y hCG como obtenida a partir de datos de estabilidad en tiempo real. Se ha presentado previamente una correlación similar entre DSC y estabilidad en tiempo real como analizado mediante SEC para anticuerpos recombinantes y glicoproteínas recombinantes

10 Datos de estabilidad en tiempo real para rFSH se determina a 30 °C. Dado que el producto de rFSH está dirigido al almacenamiento refrigerado a largo plazo, 25-30 °C es un intervalo adecuado para estudios de estabilidad acelerada. Solamente están disponibles datos de estabilidad en tiempo real para hCG para el almacenamiento durante hasta 12 semanas a 50 °C, almacenamiento durante 11 semanas a 25 °C y 40 °C y almacenamiento durante 6 semanas a 50 °C. Para temperaturas de 40 °C o menos, la disminución de la pureza de hCG es menos del 6% durante el almacenamiento tanto para formulaciones con sacarosa como con cloruro sódico y por lo tanto es difícil diferenciar entre el efecto de diversos azúcar y sales ya después de 11-12 semanas de almacenamiento. Solamente a 50 °C, las diversas formulaciones se pueden diferenciar claramente, aunque la tendencia observada a temperaturas más bajas es la misma que a 50 °C.

15 Tabla 30: La pureza como determinada mediante SEC y la temperatura de desnaturalización como determinada mediante DSC para hCG y rFSH. La pureza de hCG se determina después de 6 semanas de almacenamiento a 50 °C y la pureza de rFSH se determina después de 6 meses de almacenamiento a 30 °C.

Azúcar/sal	hCG		rFSH	
	Pureza*	ΔT_m^{**}	Pureza [#]	$\Delta T_m^{##}$
Na ₂ SO ₄	-	-2,3°C	96,1%	5,1°C
NaCl	71,7%	-2,7°C	96,9%	4,8°C
Sacarosa	83,0%	0,3°C	89,9%	0,4°C

* Muestras que contienen 10 000 UI/ ml de hCG, 154 mM de NaCl o 300 mM de sacarosa, 10 mM de tampón fosfato pH 7.

20 ** Muestras que contienen 5 mg/ml (35 300 UI/ml) de hCG, 0,1 M de azúcar o de sal, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico pH 6,5.

Muestras que contienen 600 UI/ml de rFSH, 43 mM de Na₂SO₄ o 120 mM de NaCl o 219 mM de sacarosa, 1,0 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 5 mg/ml de fenol, 1 mM de tampón fosfato sódico pH 6,5.

25 ## Muestras que contienen 2,4 mg/ml (36 300 UI/ml) de rFSH, 0,1 M de azúcar o de sal, 0,5 mg/ml de L-metionina, 0,005 mg/ml de Polisorbato 20, 1 mM de tampón fosfato sódico pH 6,5.

CONCLUSIONES

30 Estudios de estabilidad de hCG y rFSH en diversas soluciones mediante temperaturas de desnaturalización de hCG y rFSH, así como purezas de hCG y rFSH después de almacenamiento a temperaturas elevadas, proporcionan evidencia inequívoca para la influencia de diferentes azúcares y sales sobre la estabilidad de hCG y rFSH en solución. Las dos técnicas utilizadas, DSC líquida y cromatografía SEC, ambas muestran resultados concordantes. Estos resultados se han confirmado claramente mediante los presentes datos de estabilidad en tiempo real.

35 Estudios de la estabilidad de rFSH en diversas soluciones mediante cambios en la estructura secundaria de rFSH (mediante espectroscopia de DC - Ejemplo 1), temperatura de desnaturalización de rFSH (cambios en la estructura terciaria y cuaternaria mediante DSC - Ejemplo 2) o la cantidad relativa de rFSH disociada formada después de almacenamiento a 30 ± 2 °C/65 ± 5% HR (cambios en la estructura cuaternaria mediante SEC - Ejemplo 3) dan evidencia inequívoca para la influencia de conservantes y estabilizantes sobre la estabilidad de rFSH en solución. Las tres técnicas utilizadas, DC, DSC y cromatografía SEC todas muestran resultados concordantes.

40 Concluyendo de los resultados de todos los Ejemplos 1-3, se ve claramente que la adición de un conservante, fenol o alcohol bencílico, disminuye la estabilidad de rFSH en solución. Se espera que otros conservantes fenólicos, como m-cresol y clorocresol, den lugar a efectos desestabilizantes similares.

El efecto desestabilizante observado para rFSH tras la adición de conservante se corresponde bien con el conocimiento del estado de la técnica dentro del área.

5 La adición de una sal farmacéuticamente aceptable de metal alcalino Na^+ o K^+ a las soluciones de rFSH neutraliza el efecto desestabilizante de conservantes sobre rFSH y -de manera más ventajosa- incrementa la estabilidad de rFSH en solución en comparación con soluciones de rFSH que no contienen ni un conservante ni una sal. Todas las sales sódicas y potásicas probadas dan lugar a una estabilidad de rFSH incrementada, independiente de los aniones utilizados; por ejemplo, aniones inorgánicos como sulfato, cloruro y perclorato y también utilizando aniones orgánicos como citrato, acetato y tartrato. Variando el catión de las sales produce un gran impacto sobre el grado de estabilización de rFSH; cationes monovalentes, específicamente sales con el catión sodio o potasio, dan lugar a un efecto 10 estabilizante pronunciado sobre rFSH. La adición de perclorato sódico a una solución de rFSH da lugar a las soluciones de rFSH más estables, sin embargo, percloratos generalmente son muy reactivos y agentes oxidantes, y por lo tanto los percloratos no están aprobados como ingredientes inactivos en formulaciones farmacéuticas. Por lo tanto, sales sódicas o sales potásicas de sulfato y cloruro, son los agentes estabilizantes más favorables.

15 La adición de sacarosa a soluciones de hCG o rFSH producen un ligero incremento en la estabilidad de la proteína, tanto para hCG como para rFSH, mientras que la adición de cloruro sódico tiene un efecto desestabilizante sobre hCG y un efecto estabilizante sobre rFSH (ver el Ejemplo 4). La adición de perclorato sódico a soluciones de hCG y rFSH tiene un efecto estabilizante tanto sobre hCG como sobre rFSH (ejemplo 4). El efecto estabilizante de estas sales en soluciones de rFSH es, sorprendentemente, claramente mejor que el efecto estabilizante observado para sacarosa.

Las conclusiones de estos resultados son las siguientes:

20 1) en las condiciones estudiadas, los efectos de la sal sobre la estabilidad de hCG y rFSH no sigue la serie de Hoffmeister

2) a pesar del hecho de que hCG y FSH son estructuralmente muy similares (es decir pertenecen a la misma clase de proteínas, son ambas glicosiladas y ambas consisten en dos subunidades, de las cuales subunidad α es idéntica en las dos proteínas), el efecto de diversos azúcar y sales como sacarosa y cloruro sódico sobre la estabilidad de la proteína es diferente para hCG y rFSH. De manera muy sorprendente, para las proteínas muy similares como hCG y rFSH, las sales no muestran el mismo efecto estabilizante. 25

3) Sales de Na^+ y K^+ muestran su efecto estabilizante en soluciones de FSH, independientemente de los aniones utilizados.

30 4) el efecto estabilizante de sales de Na^+ y K^+ sobre soluciones de FSH puede contrarrestar el efecto desestabilizante de conservantes.

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

Las siguientes abreviaturas y definiciones se usan a lo largo del texto y en los Ejemplos:

ΔT_m : Cambio en la temperatura de desnaturalización tras la adición de un conservante o sal, ver además T_m

TRA: Técnicas de reproducción asistida

35 AB: Alcohol bencílico

BTG : Biotecnología General

DC: Dicroísmo Circular

CHO : Ovario de hámster chino

CdA: Certificado de Análisis

40 ADN: Ácido desoxirribonucleico

DSC : Calorimetría Diferencial de Barrido

DSF: Disfunción Sexual Femenina

FSH : Hormona Folículo Estimulante

hCG: Gonadotropina Coriónica Humana

UI: Unidades internacionales, una medida de la bioactividad de rFSH como determinada mediante un bioensayo Steelman-Pohley, de acuerdo con Ph. Eur. y USP.

IIU: Inseminación intrauterina

LC-UV : Cromatografía líquida con detección Ultra Violeta

5 LH: Hormona Luteinizante

BPM: Forma de Bajo Peso Molecular, consisten principalmente o únicamente de proteína monomérica disociada.

IO: Inducción de la ovulación

p.a. : Grado Analítico (Pro Analysis)

Ph. Eur. : Farmacopea Europea

10 HR: Humedad Relativa

rFSH : Hormona Folículo Estimulante humana recombinante

SEC : Cromatografía de Exclusión por Tamaño

SRCD : Dicroísmo Circular de de Radiación de Sincrotrón

15 T_m : Punto medio de la transición térmica o punto medio de transición o temperatura de desnaturalización la temperatura cuando la mitad de las moléculas de proteína están plegadas y la mitad de las moléculas de proteína están desplegadas.

TRIS : 2-Amino-2-hidroximetil-propan-1,3-diol

TSH : Hormona Estimulante de la Tiroides

USP : Farmacopea de Estados Unidos

20 UV : Ultra Violeta

REIVINDICACIONES

1. Uso de sales que comprenden cationes alcalinos farmacéuticamente aceptables para limitar la tendencia de FSH a disociarse en una formulación líquida de FSH, donde la sal es Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 .
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, donde la sal está comprendida en una cantidad de 20 a 500 mM, o en una cantidad de 30-300 mM o en una cantidad de 50-200 mM.
3. Uso según la reivindicación 1 y/o 2, donde la formulación de FSH es una formulación de rFSH.
4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la formulación adicionalmente comprende un conservante.
5. Uso según la reivindicación 4, donde la formulación comprende alcohol bencílico, fenol y/o m-cresol.
- 10 6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la formulación es una formulación inyectable.
7. Método para limitar la tendencia de FSH a disociarse en una formulación líquida de FSH donde el método comprende la etapa de una adición a dicha formulación de sales que comprenden cationes de metales alcalinos farmacéuticamente aceptables, donde dicha sal es Na_2SO_4 o una combinación de NaCl y Na_2SO_4 .
8. Método según la reivindicación 7, donde la FSH es rFSH.
- 15 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y/o 8, donde la formulación adicionalmente comprende un conservante.
10. Método según la reivindicación 9, donde el conservante se selecciona del grupo que consiste en alcohol bencílico, fenol y m-cresol.

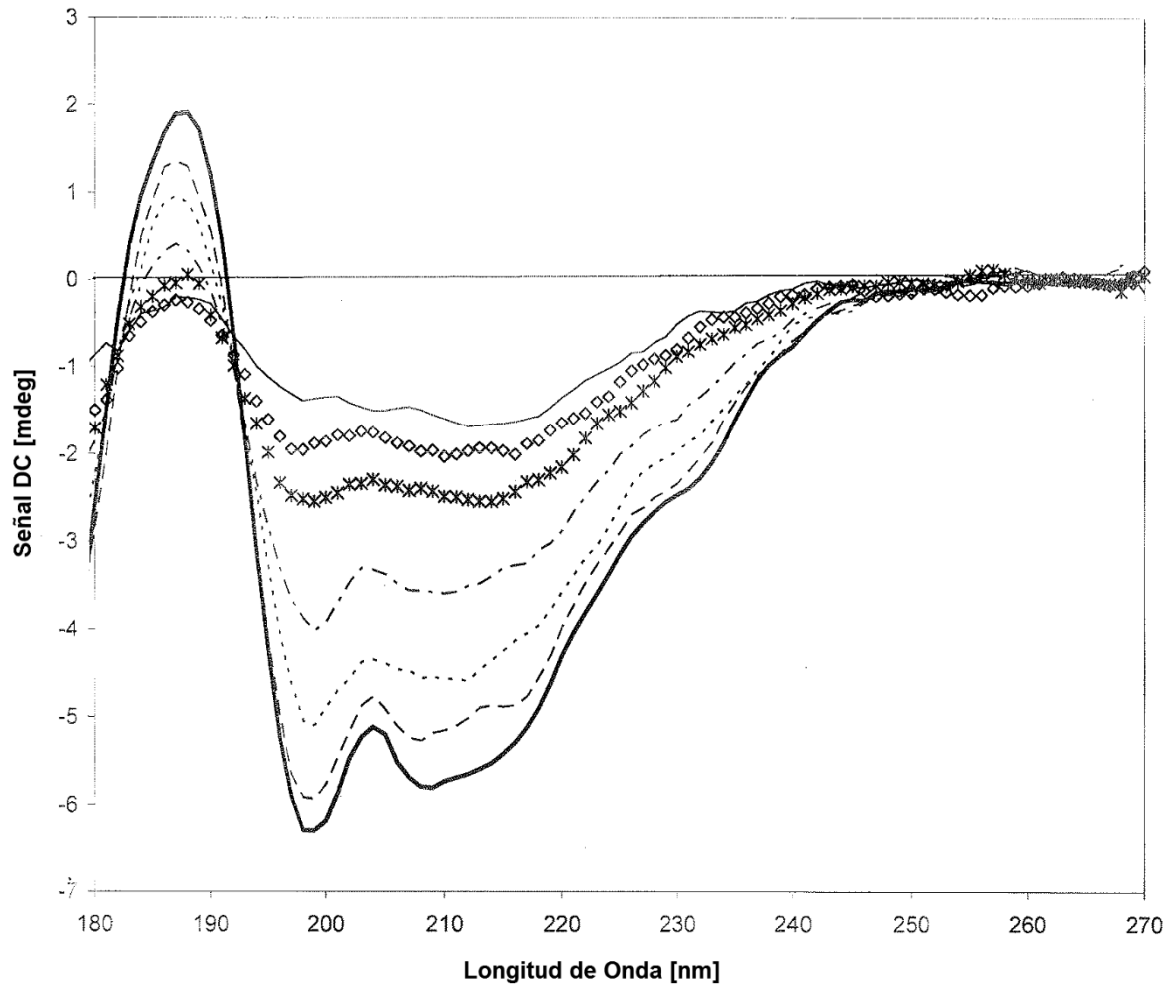


Figura 1

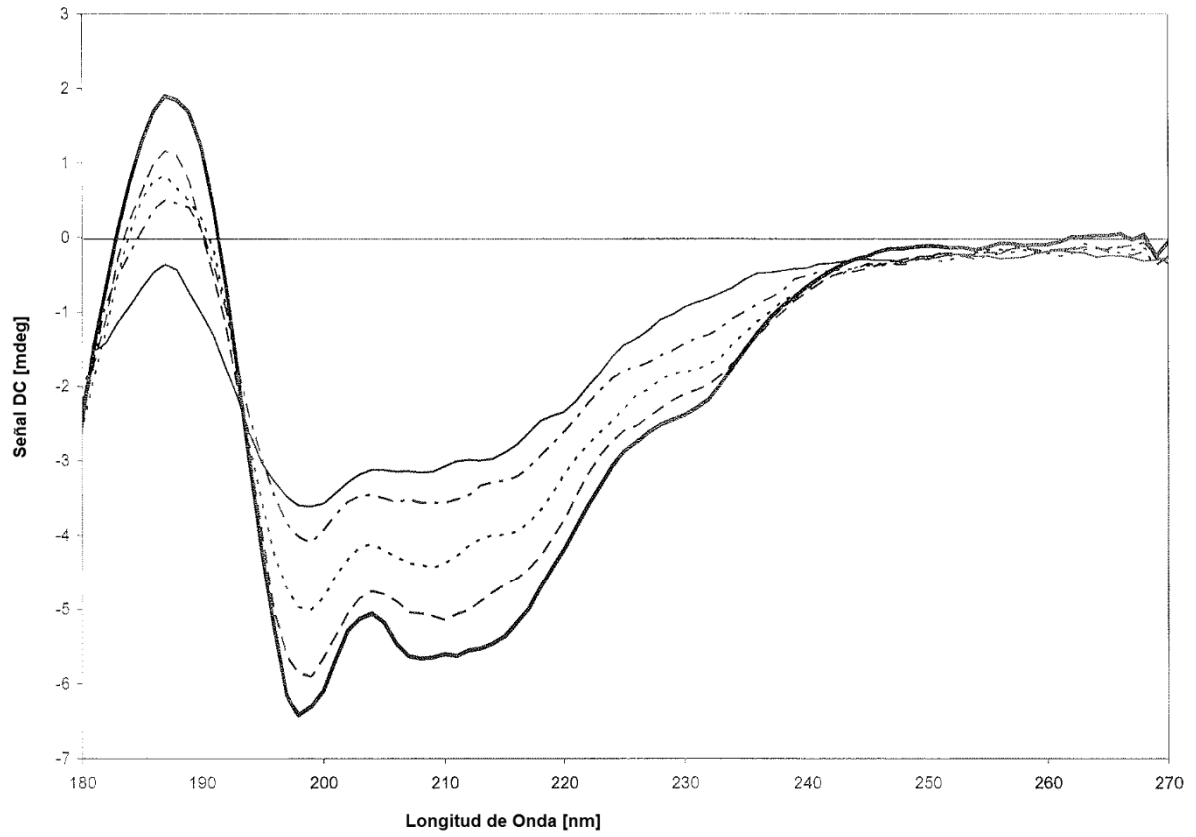


Figura 2

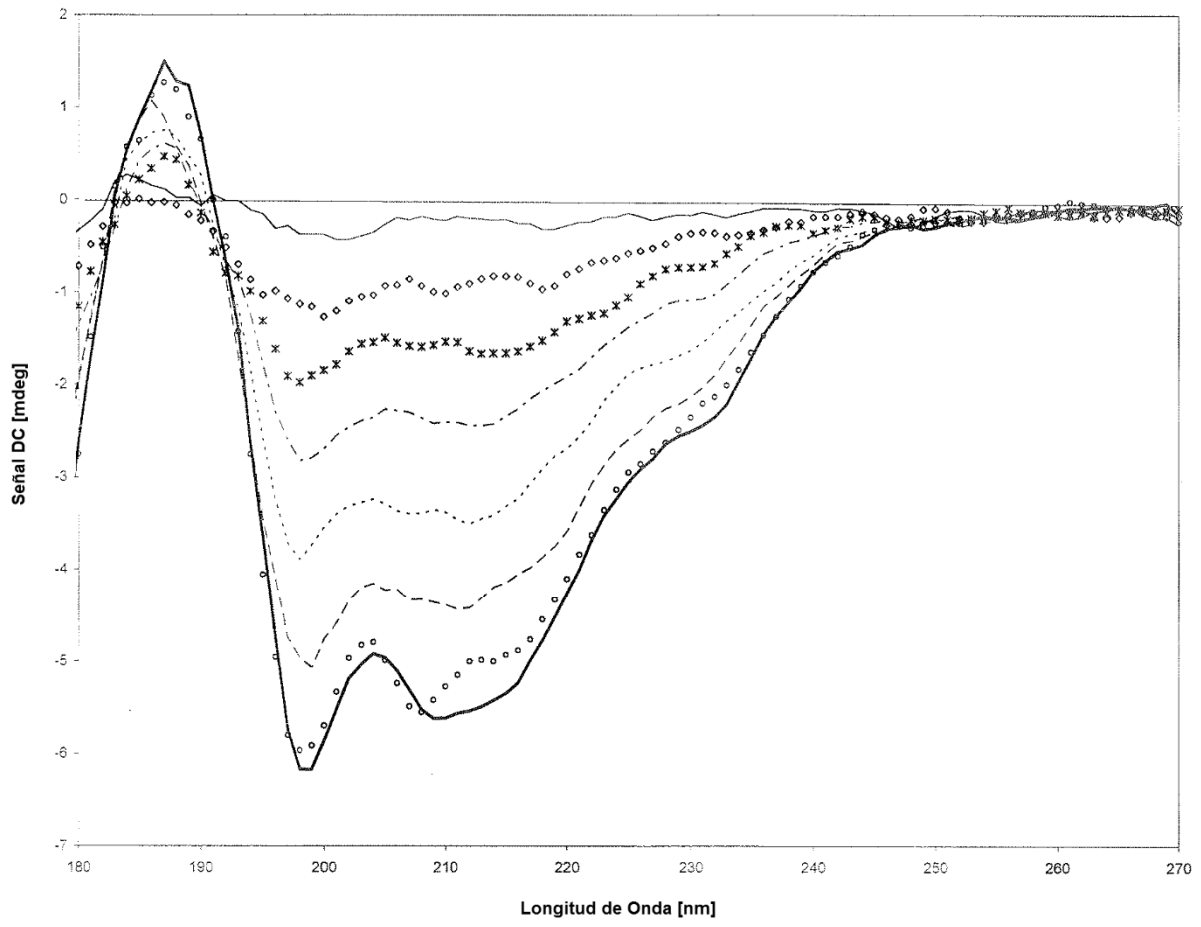


Figura 3

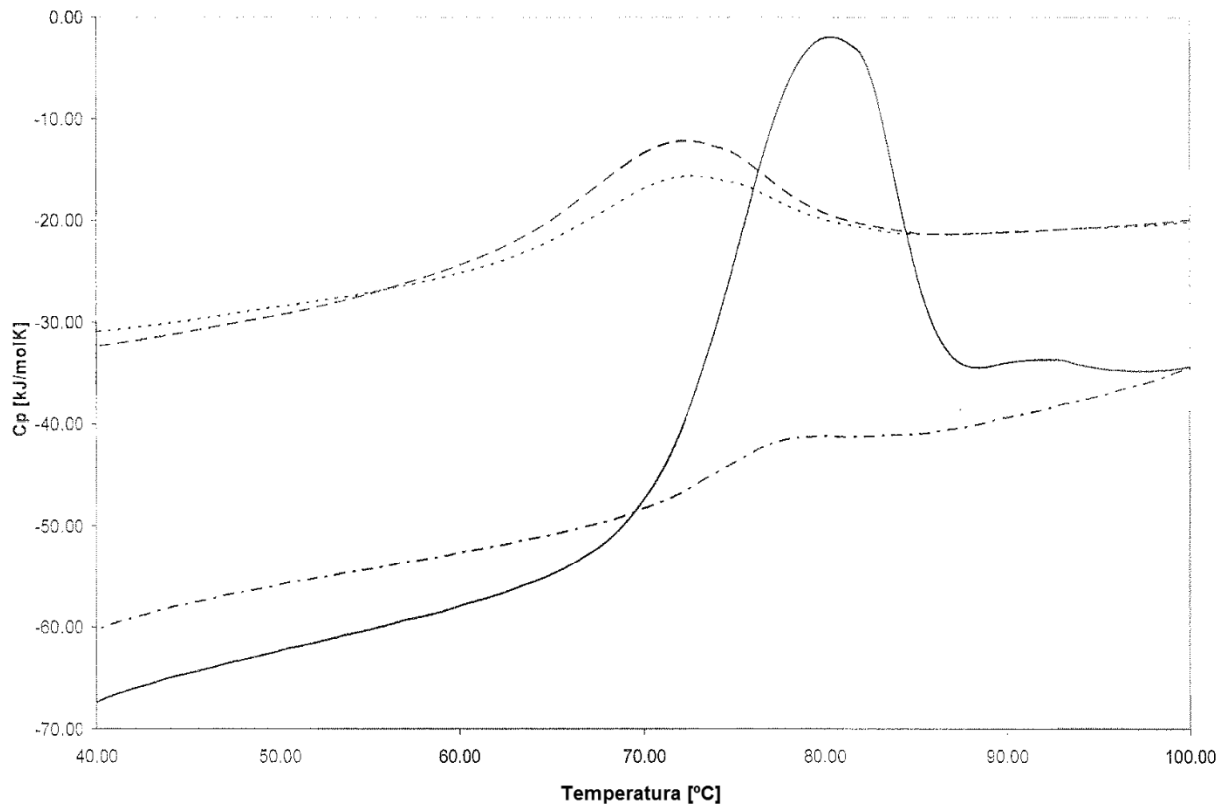


Figura 4

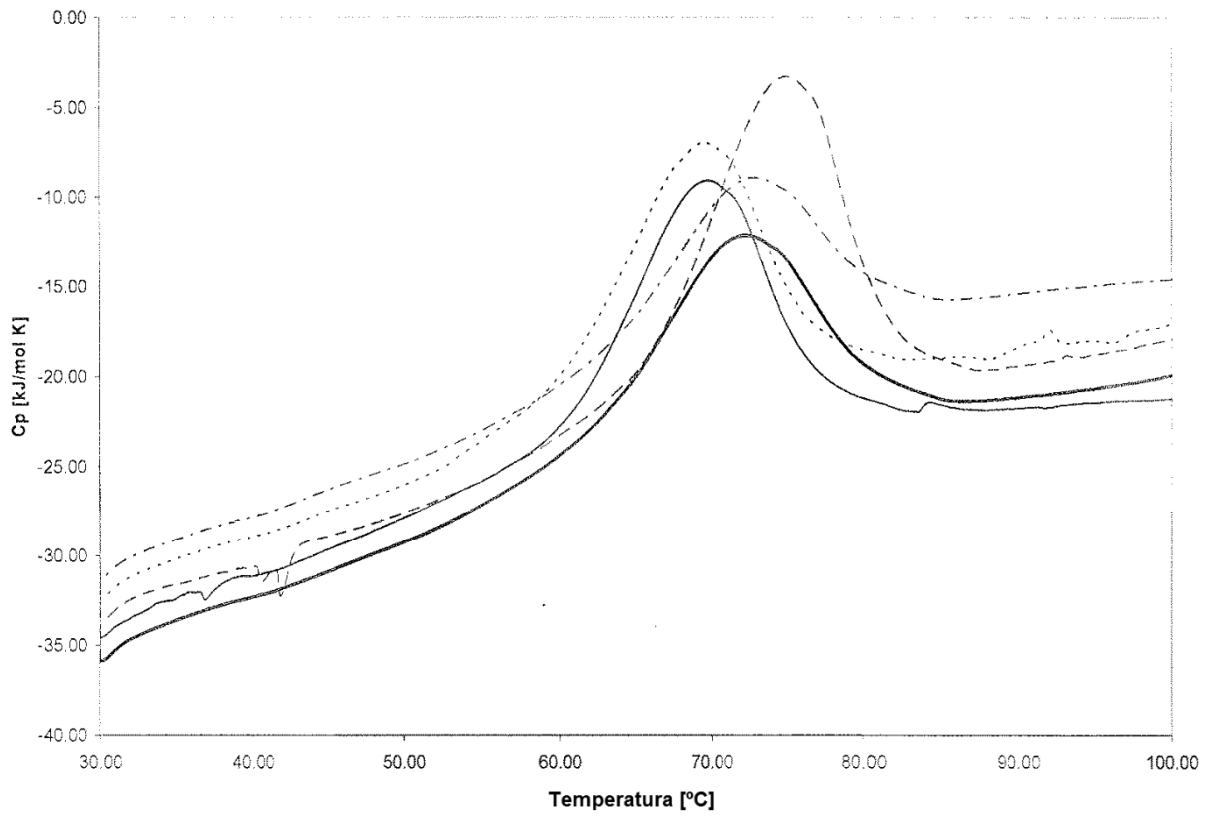


Figura 5

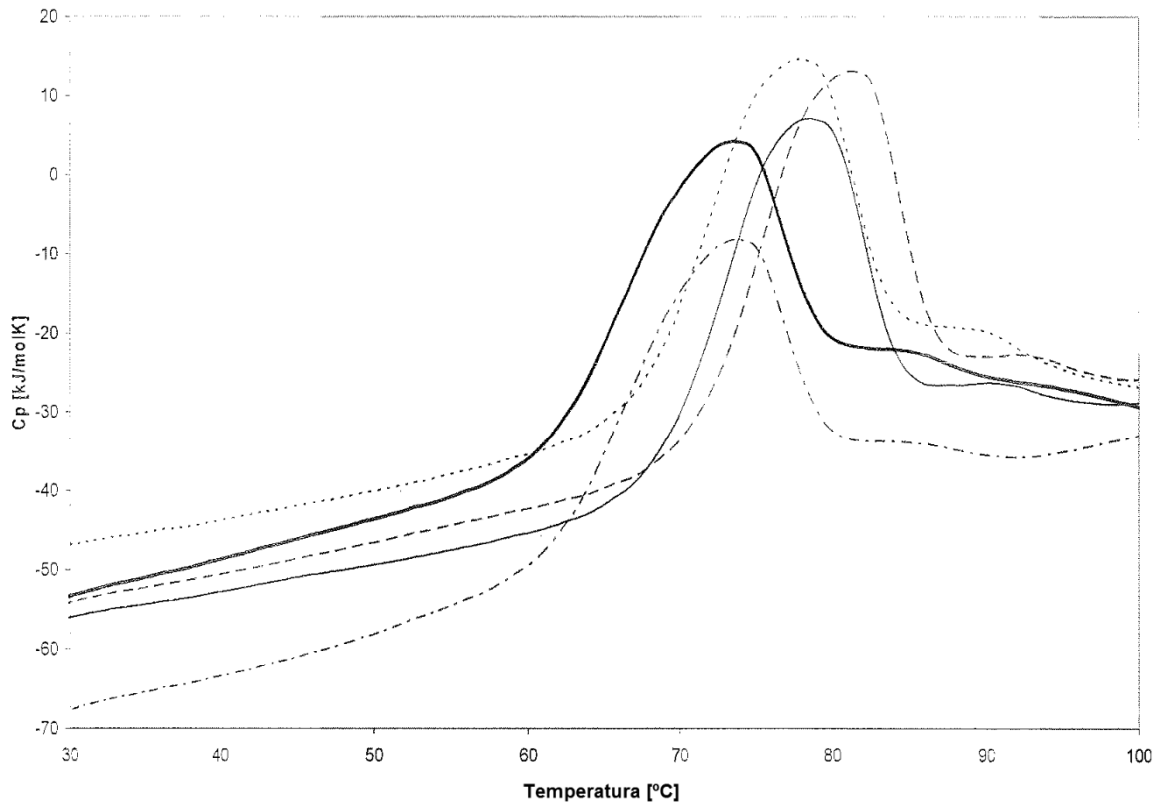


Figura 6