

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036383**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.11.03**

(21) Номер заявки  
**201891905**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.02.24**

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 47/18* (2017.01)

---

(54) **СТАБИЛЬНАЯ ЖИДКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ГОНАДОТРОПИНА**

---

(31) **1603280.7**

(32) **2016.02.24**

(33) **GB**

(43) **2019.02.28**

(86) **PCT/EP2017/054325**

(87) **WO 2017/144659 2017.08.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ФЕРРИНГ Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:  
**Сьёгрэн Хелен Ульрика (SE), Хейер-  
Педерсен Шарлотт (DK)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) EP-A1-2417982  
EP-A-0974359  
US-A-5929028  
WO-A2-2011099036  
WO-A1-2015075743

---

(57) Изобретение относится в целом к области стабилизации композиций гонадотропина, в частности жидких композиций гонадотропинов. Стабилизации достигают посредством конкретной комбинации эксципиентов, предпочтительно аргинина и метионина. В предпочтительном варианте осуществления композиция не содержит буфера.

---

**B1**

**036383**

**036383**

**B1**

### **Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

Настоящее изобретение относится в целом к области стабилизации композиций гонадотропина, в частности жидких композиций гонадотропинов. Стабилизации достигают посредством конкретной комбинации эксципиентов, предпочтительно аргинина и метионина. В предпочтительном варианте осуществления композиция не содержит буфера.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Гонадотропины представляют собой семейство гормонов, которые по существу и в основном вовлечены в репродуктивный цикл у женщин и мужчин. Гонадотропины могут быть выделены из мочи как для исследовательских, так и для лечебных целей, однако некоторые гонадотропины, такие как, например, ХГЧ, ЛГ и ФСГ, могут также быть получены рекомбинантно.

В частности, гонадотропины могут использоваться при лечении бесплодия.

Все четыре основных гонадотропина принадлежат к одному и тому же семейству гликопротеинов. Они представляют собой фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреотропный гормон (ТТГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ) и (человеческий) хорионгонадотропин (ХГЧ). Все эти гонадотропины являются гетеродимерными и состоят из альфа- и бета-субъединицы; альфа-субъединица является общей для всех, т.е. одинаковой для всех вышеуказанных четырех гонадотропинов, в то время как бета-субъединица различается, соответственно. Действие ФСГ опосредовано отдельным рецептором ФСГ. Бета-цепи ЛГ и ХГЧ имеют 82% гомологии последовательности белка и проявляют свое действие через один и тот же рецептор ЛГ.

ФСГ естественным образом секретируется передней долей гипофиза и функционирует, чтобы поддерживать развитие фолликулов и овуляцию. ФСГ содержит альфа-субъединицу из 92 аминокислот, также одинаковую с другими гликопротеиновыми гормонами, например ЛГ и ХГЧ, и бета-субъединицу из 111 аминокислот, уникальную для ФСГ, которая придает биологическую специфичность гормону (Pierce and Parsons, 1981, *Glycoprotein hormones: structure and function*, *Ann Rev Biochem.*, 50: 465-495). Зрелая бета-субъединица ХГЧ состоит из 145 аминокислот. Каждая субъединица в ФСГ и ХГЧ посттрансляционно модифицируется при добавлении остатков сложного углевода. В случае ФСГ обе субъединицы несут два участка для присоединения N-связанного гликана, альфа-субъединица по аминокислотам 52 и 78 и бета-субъединица по аминокислотным остаткам 7 и 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). ФСГ, таким образом, гликозилируется до около 30% по массе (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). Бета-субъединица ХГЧ содержит как N-, так и O-гликозилирование (N-13, N-30, O-121, O-127, O-132 и O-138). Избыточное гликозилирование в бета-субъединице ХГЧ делает ее более гидрофильной, чем бета-субъединица ФСГ.  $\beta$ -субъединицы обеспечивают специфичность для взаимодействия с рецептором.

Выделенные из мочи гонадотропины применяют в клинической практике в течение более 40 лет, и их безопасность хорошо установлена. С течением времени были внедрены новые поколения выделенного из мочи гонадотропина с более высокой степенью очистки (НР) по сравнению с первым поколением. Увеличенную чистоту получают при добавлении дополнительных стадий очистки, таких как стадии анионообменной хроматографии и хроматографии с гидрофобным взаимодействием, для удаления белков мочи, не обладающих биологической активностью ФСГ и/или ЛГ. Значительно увеличенная чистота нового поколения препаратов гонадотропина способствует более тщательным исследованиям для характеристики, обеспечивающим дополнительную информацию по составу.

Очищенные мочевой ФСГ и человеческие менопаузальные менотропины (МГЧ), оба выделенные из мочи постменопаузальных женщин, в течение многих лет применялись для лечения бесплодия, чтобы либо индуцировать (моно)овуляцию или стимулировать множественные фолликулы у пациентов, которым проводилась контролируемая стимуляция яичников (COS) перед применением технологий искусственного оплодотворения (ART). Две рекомбинантные версии ФСГ, Gonal-F® (фоллитропин альфа, Merck Serono) и Puregon®/Follistim® (фоллитропин бета, Merck) стали доступными в середине 1990-х гг. Оба продукта экспрессируются в клеточных линиях яичника китайского хомяка (CHO) (Howies, C.M. (1996), *genetic engineering of human FSH (Gonal-f)*, *Hum Reprod. Update*, 2:172-191).

Клетки CHO, как правило, применяют для получения фармацевтических рекомбинантных белков. Методами структурного анализа установлено, что сиаловая кислота присоединяется исключительно посредством  $\alpha$ -2,3-связи. Многие человеческие гликопротеины содержат смесь как  $\alpha$ -2,3-, так и  $\alpha$ -2,6-связей для остатков сиаловой кислоты. Следовательно, рекомбинантные белки, экспрессируемые с использованием системы CHO, будут отличаться от их природных аналогов по типу связей с концевой сиаловой кислотой.

### Бесплодие

В контексте настоящего изобретение "бесплодие" будет определено как пониженная способность или неспособность зачать и иметь потомство. Женщин, способных забеременеть, но затем имеющих повторяющиеся невынашивания, также считают бесплодными. Бесплодие также конкретно определяют, как невозможность к зачатию после года регулярных половых контактов без применения контрацепции. Бесплодие может быть обусловлено многими причинами. Исследования показали, что немногим более половины случаев бесплодия является результатом состояния женщин. Оставшиеся случаи вызваны нарушением функции сперматозоидов и невыясненными факторами.

В настоящее время существует несколько возможностей для лечения бесплодия.

Таковыми возможностями являются половые контакты в рассчитанное время, применение вспомогательных репродуктивных технологий (ART), медицинская терапия эндометриоза, индукция овуляции (OI), лечение миомы и нарушений половой функции у женщин (FSD) и хирургическое вмешательство для коррекции патологий.

При вспомогательных репродуктивных технологиях и OI применяют лекарственные средства для стимуляции овуляции. Наряду с ФСГ, который прежде всего является ответственным за стимуляцию яичников, препараты гонадотропина могут содержать ЛГ и/или ХГЧ.

Некоторые различные лекарственные продукты, содержащие гормоны гонадотропина, полученные из мочи беременных или постменопаузных женщин, в настоящее время применяют в клинической практике для лечения бесплодия, такие как препараты МГЧ (менопаузальных гонадотропинов человека), содержащие биологические активности ФСГ и ЛГ в отношении 1:1 (см., например, версию 35 USP, монографию по менотропинам), а также препараты, содержащие только биологическую активность ФСГ. Начиная с 1995 года стали доступными продукты гонадотропина, изготовленные посредством технологии рекомбинантных ДНК.

Следовательно, является важным предоставить стабилизированные композиции таких соединений гонадотропина либо по отдельности, либо в смеси.

Таким образом, целью настоящего изобретения является предоставить композиции, в частности жидкие композиции одного или нескольких гонадотропинов, в особенности композицию, содержащую ХГЧ, необязательно в комбинации с ФСГ, которые являются стабильными. Дополнительной целью настоящего изобретения является предоставить способ стабилизации таких композиций. Еще одной целью является предоставить такую композицию, которая является стабильной в течение 12 месяцев, предпочтительно в течение 24 месяцев, даже более предпочтительно в течение 24 месяцев при условиях хранения плюс 1 месяц "при использовании", т.е. при комнатной температуре.

#### Краткое раскрытие сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к стабильным жидким композициям гонадотропина. В предпочтительном варианте осуществления эти композиции содержат ХГЧ. В также предпочтительном варианте осуществления эта композиция содержит как ФСГ, так и ХГЧ. Гонадотропины в композициях согласно изобретению предпочтительно являются выделенными из мочи или выделенными из плазмы, но в альтернативном варианте осуществления могут быть получены рекомбинантным способом.

В дальнейшей части описания термин "МГЧ" будет использоваться взаимозаменяемо с термином "гонадотропины из мочи". В основном, гонадотропины из мочи будут представлять собой гонадотропины из мочи человека.

Хорионгонадотропин человека (ХГЧ) способствует активности ЛГ (лютеинизирующего гормона), который является ответственным за разрешенные к применению в настоящее время фармацевтические назначения. Это является хорошо известным фактом и описано в виде части Кратких характеристик лекарственного средства (SmPC) для препаратов МГЧ, таких как продукт Менопур®, разрешенный к применению при таких же показаниях, какие заявлены в настоящее время. Менопур® - в этих Кратких характеристиках лекарственного средства - содержит активность ФСГ и ЛГ, но дополнительно подтверждает, что ХГЧ является ответственным по меньшей мере за часть активности ЛГ. Таким образом, любая ссылка на ХГЧ в контексте настоящего изобретения охватывает композиции, которые содержат активность ЛГ, которая является обусловленной ХГЧ.

Предпочтительные варианты осуществления включают следующее.

1. Жидкая фармацевтическая композиция гонадотропина, содержащая гонадотропин, аргинин в количестве от 50 до 160 мМ и метионин в количестве от 0,05 до 1,5 мг/мл, где композиция не содержит дополнительного буфера и где рН композиции находится между 6,0 и 7,5.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где гонадотропин содержит ХГЧ (хорионгонадотропин человека) и необязательно ФСГ и/или ЛГ.

3. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2, где гонадотропин содержит МГЧ (менопаузальный гонадотропин человека).

4. Фармацевтическая композиция по любому одному из пп.1-3, где гонадотропин (такой как ФСГ, ЛГ и/или ХГЧ) имеет человеческое происхождение и является выделенным из мочи.

5. Фармацевтическая композиция по любому одному из пп.1-3, где гонадотропин (такой как ФСГ, ЛГ и/или ХГЧ) является рекомбинантным.

6. Фармацевтическая композиция по любому одному из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая консервант, предпочтительно фенол.

7. Фармацевтическая композиция по любому одному из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая поверхностно-активный агент, предпочтительно полисорбат, даже более предпочтительно полисорбат 20.

8. Фармацевтическая композиция по п.6 или 7, где консервант, предпочтительно фенол, присутствует в количестве 4-6 мг/мл, предпочтительно в количестве 5 мг/мл.

9. Фармацевтическая композиция по п.7 или 8, где поверхностно-активный агент, предпочтительно полисорбат 20, присутствует в количестве 0,001-0,05 мг/мл, предпочтительно в количестве 0,005 мг/мл.

10. Фармацевтическая композиция по любому одному из предшествующих пунктов, где аргинин предпочтительно представляет собой L-аргинин HCl.

11. Фармацевтическая композиция по любому одному из предшествующих пунктов, где МГЧ присутствует в количестве 300-900, более предпочтительно 500-700, даже более предпочтительно 600-650, очень предпочтительно 625 МЕ/мл.

12. Фармацевтическая композиция по любому одному из предшествующих пунктов, которая состоит из

625 МЕ/мл МГЧ,

0,15 мг/мл метионина,

150 мМ аргинина,

5 мг/мл фенола,

0,005 мг/мл полисорбата 20,

воды для инъекций (ВДИ),

где композиция имеет рН  $6,8 \pm 0,3$ .

13. Жидкая фармацевтическая композиция, описанная в любом одном из предшествующих пунктов, для применения в способе лечения бесплодия.

14. Фармацевтическая композиция для применения по п.13, где лечение представляет собой индукцию овуляции (ОИ), вспомогательные репродуктивные технологии (АРТ) и/или лечение гипогонадотропного гипогонадизма у мужчин.

15. Способ стабилизации жидкой фармацевтической композиции, содержащей МГЧ, который включает следующие стадии:

предоставление образца мочи от женщины,

экстракция МГЧ,

смешивание указанного экстракта с аргинином и метионином в количествах, определенных в любом из предшествующих пунктов,

необязательное дополнительное добавление фенола и полисорбата в количествах, определенных в любом из предшествующих пунктов,

регуляция рН для обеспечения композиции с рН между 6,0 и 7,5,

где не добавляют дополнительного буфера.

Как описано выше, гонадотропины, например ФСГ и ХГЧ, а также ЛГ являются применимыми для лечения бесплодия. В этой связи становится понятным, что жидкие композиции этих гонадотропинов могут быть нестабильными; это характерно даже для тех гонадотропинов, которые предназначены для однократного применения. Нестабильность может быть даже более выраженной, если жидкие композиции содержат консервант, который, например, предписан для всех многодозовых композиций.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть предназначены для однократного или для многократного применения соответственно.

ФСГ, составляемый в композиции согласно настоящему изобретению, может быть мочевым или выделенным из плазмы или рекомбинантным ФСГ (рФСГ). В предпочтительном варианте осуществления, ФСГ представляет собой мочевой ФСГ или рФСГ; особенно предпочтительным является мочевой ФСГ.

Как указано выше, в настоящее время возможно получать гонадотропины, такие как ФСГ, ЛГ или ХГЧ рекомбинантным способом. Таким образом, ссылка в описании настоящего изобретения на гонадотропин, как правило, всегда включает гонадотропин, выделенный из мочи или из плазмы, а также рекомбинантный (р)гонадотропин, если не установлено иначе. Таким образом, например, ссылка на "ФСГ" всегда охватывает рФСГ. Получение и аминокислотные последовательности, а также все последовательности нуклеиновых кислот для ФСГ, ХГЧ и ЛГ являются хорошо известными специалисту в области техники настоящего изобретения.

Последовательности, которые могут применяться в контексте настоящего изобретения, являются следующими:

Альфа-субъединица ФСГ, ЛГ и ХГЧ (SEQ ID NO: 1)

(см. также Fiddes, J.C. and Goodman, H.M. gene encoding the common alfa subunit of four human

glycoprotein hormones. J. Mol. Appl. Genet. 1(1), 3-18 (1981)):

MDYYRKYAAIFLVTLVSVFLHVLHSAPDVQDCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCCFSR

AYPTPLRSKKTMLVQKNVTSESTCCVAKSYNRVTVMGGFKVENHTACHCSTCYHNKS

(подчеркнутая часть является лидерным пептидом) (116);

Бета-субъединица ФСГ (SEO ID NO: 2)

(см. также Saxena, B.B. and Rathnam, P. Amino acid sequence of the beta subunit of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. J. Biol. Chem. 251(4), 993-1005 (1976)):

MKTLQOFFFLFCCWKAICCNSELTNITIAIEKEEERFCISINTTWAGYCYTRDLVYKD

PARPKIQKTCTFKELVYETVRVPGCAHNSLYTYPVATQCHCGKCDSDSDTCTVRGLGPSYCS

FGEMKE

(подчеркнутая часть является лидерным пептидом) (129);

Бета-субъединица HCG (SEO ID NO: 3)

(см. также Fiddes, JC, Goodman HM. The cDNA for the beta-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by read through into 3'-untranslated region Nature. 1980 Aug 14; 286(5774):684-7):

MEMFOGLLLLLLLLLSMGGTASKEPLRPCR PINATLAVEK EGCPVCITVN

TTICAGYCPT MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV

SYAVALSCQC ALCRRSTTDC GPKDHPLTC DDPRFQDSSS SKAPPPSLPS

PSRLPGPSDT PILPQ

(подчеркнутая часть является лидерным пептидом) (165);

Бета-субъединица ЛГ (SEQ ID NO: 4)

(см. также Sairam, M.R. and Li, C.E. Human pituitary lutropin. Isolation, properties, and the complete amino acid sequence of the beta-subunit Biochim. Biophys. Acta 412 (1), 70-81 (1975)):

MEMLOGLLLLLLLLLSMGGAWASREPLRPWCH PINAILAVEKEGCPVCITVN

TTICAGYCPTMMRVLQAVLPPLPQVVCTYRDVRFESIRLPGCPRGVDPVVSFPVALSCRCGPCR

RSTSDC GPKDHPLTC DHPQLSGLLFL

(подчеркнутая часть является лидерным пептидом) (141).

Такие, например, композиции ФСГ пролонгированного действия могут быть получены способами, как правило, известными специалисту в области техники настоящего изобретения, например модификацией молекулы ФСГ или модификацией композиции.

"ФСГ", как используют в описании настоящего изобретения, таким образом, охватывает все возможные выделенные из мочи или рекомбинантные формы вышеуказанного ФСГ, а также все возможные комбинации форм ФСГ. Также охваченной является композиция для однократного применения и одна или более дополнительных композиций (такого же или отличающегося гонадотропина) для многодозового применения.

Одним возможным продуктом может быть композиция, включающая ФСГ (в предпочтительном варианте осуществления также включающая ХГЧ и/или необязательно ЛГ, активность ЛГ и т.д.), все из которых содержатся в различных контейнерах. Активность ЛГ, если присутствует, может происходить от ЛГ или ХГЧ. ЛГ можно заменить эквивалентной дозой ХГЧ и наоборот; "эквивалентную дозу" в этом контексте можно рассчитать, как хорошо известно в области техники настоящего изобретения.

Особенно предпочтительной комбинацией гонадотропина

является комбинация ФСГ и ХГЧ, предпочтительно, такая как композиция МГЧ в одном контейнере, но необязательно также, например, в различных контейнерах, как, например, флаконы или картриджи.

Возможные комбинации, которые также могут быть представлены в различных контейнерах, также включают: мочевой (м)ФСГ и мХГЧ или мФСГ и мЛГ; дополнительно (р)ХГЧ или рЛГ или рФСГ) и (м)ХГЧ или мЛГ или (р)ХГЧ или рЛГ), и все возможные их сочетания. В очень предпочтительном варианте осуществления композиция согласно настоящему изобретению содержит ФСГ и ХГЧ. В другом в равной степени предпочтительном варианте осуществления композиция согласно настоящему изобретению содержит ХГЧ.

Композиции гонадотропина согласно настоящему изобретению представляют собой жидкие композиции. Предпочтительно композиция является инъекционной. Композиции могут поставляться в виде продукта, имеющего один, два или более фармацевтических составов, включающих ФСГ или ФСГ/ХГЧ и/или ЛГ, для раздельного или совместного введения. При раздельном введении может быть последовательным. Продукт может быть поставлен в любой соответствующей упаковке. Например, продукт может содержать ряд предварительно заполненных шприцев, каждый из которых включает ФСГ (состав ФСГ), или дополнительно ХГЧ (состав ХГЧ), например, где шприцы могут быть упакованы в блистерную упаковку или другое средство для поддержания стерильности. Продукт может необязательно содержать инструкции по применению композиций гонадотропина.

Согласно дополнительному аспекту композицию гонадотропина согласно настоящему изобретению обеспечивают в виде многодозового препарата. Настоящее изобретение, однако, однозначно также на-

правлено на композиции, предназначенные для однократного применения. Настоящее изобретение также относится к стабилизации композиций как части набора. Такой набор будет содержать по меньшей мере один контейнер, содержащий одну или более суточных доз гонадотропина, например ФСГ, или, например, два контейнера (например, флакона), каждый из которых содержит различный гонадотропин, такой как ХГЧ, и, например, дополнительные инструкции (например, по введению) и, например, дополнительное средство для инъекции. В предпочтительном варианте осуществления применяют шприц-ручку для инъекций, посредством которой раствором гонадотропина заполняют соответствующие картриджи. Активные ингредиенты могут находиться в различных картриджах, но могут, конечно, инъекционно вводиться одновременно или в последовательном порядке, как хорошо известно специалисту в области техники данного изобретения. Два или более активных ингредиента также могут находиться внутри одного и того же картриджа.

В очень предпочтительном варианте осуществления композиция согласно настоящему изобретению предназначена для парентерального применения, даже более предпочтительно для подкожной инъекции.

В предпочтительном варианте осуществления МГЧ присутствует в композиции в количестве 35-850 МЕ/мл, предпочтительно 50 -800 МЕ/мл, даже более предпочтительно 100-700 МЕ/мл, наиболее предпочтительно 625 МЕ/мл, типовым образом в многодозовой композиции.

Особенно предпочтительная композиция эксципиентов для многодозовой композиции, содержащей МГЧ, как описано выше, и/или содержащей МГЧ и/или ХГЧ и/или все другие гонадотропины, указанные как имеющие отношение к настоящему изобретению, имеют следующий состав:

50-160 мМ аргинина HCl, предпочтительно 150 мМ аргинина HCl,  
от 0,05 до 1,5 мг/мл, предпочтительно 0,15 мг/мл, L-метионина,  
0,001-0,05 мг/мл, предпочтительно 0,005 мг/мл полисорбата 20,  
от 4,0 до 6,0 мг/мл, предпочтительно 5,0 мг/мл фенола,  
pH от 6,0 до 7,5, предпочтительно pH  $6,8 \pm 0,3$ , (pH относится к pH целого раствора),  
ВДИ.

Типовые концентрации активного ингредиента для композиций, содержащих рекомбинантный ХГЧ и/или ФСГ, являются следующими, несмотря на то, что концентрация активного ингредиента не имеет какого-либо влияния на характеристики настоящего изобретения:

для рФСГ: 30-150 мкг/мл;

для рХГЧ: 5-200 мкг/мл.

Предпочтительные эксципиенты для таких рекомбинантных композиций являются такими же, как описано выше для многодозовой композиции МГЧ. Типовые однодозовые композиции также являются охваченными настоящим изобретением и могли бы быть такими же, как описано выше, с тем исключением, что они не могут содержать консервант, такой как фенол.

Инъекционные депо-формы могут быть получены посредством образования микроинкапсулированных матриц гонадотропина (и других средств, если они присутствуют) в биоразрушаемых полимерах. Депо-формы/системы с замедленным высвобождением на полимерной основе могут, в зависимости от их химической природы, представлять собой, например микро- или наночастицы, гидрогели, мицеллы, эмульсии или имплантаты. В зависимости от отношения гонадотропина к полимеру и природы конкретного используемого полимера, скорость высвобождения гонадотропина может контролироваться. Примеры биоразрушаемых полимеров включают системы сополимера полилактида/полигликолида, поливинилпирролидон, поли(сложные ортоэферы), поли(ангидриды), поли(этиленгликоль), полиаминокислоты, полисахариды, например, гиалуронат натрия (NaHA) или их другие соли, желатин, хитозан и т.д. Все указанные полимеры могут быть дериватизированы или модифицированы для оптимизации доставки белкового лекарственного средства или его стабильности. Инъекционные депо-композиции также получают посредством захвата гонадотропина жидкими системами или полимерными липидными смесями, такими как мицеллы, липосомы или микроэмульсии, которые являются совместимыми с тканями организма.

Инъекционные композиции могут быть стерилизованы, например, посредством фильтрации через удерживающий бактерии фильтр и/или посредством введения стерилизующих агентов. Возможно образовывать стерильные твердые составы, которые могут быть растворены или диспергированы в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед применением. Инъекционные композиции могут быть поставлены в любом подходящем контейнере, например флаконе, предварительно заполненном шприце, инъекционных картриджах и т.п., как описано выше.

pH и точную концентрацию различных компонентов композиции для применения в виде фармацевтического состава, как описано в настоящем изобретении, в основном регулируют в соответствии с рутинной практикой в этой области, см., например, *The textbook of Pharmaceutical Medicine, fifth edition, edited by John P. Griffin and John O'Grady*. В предпочтительном варианте осуществления составы согласно настоящему изобретению поставляют в виде композиций для парентерального введения. Общие способы получения парентеральных композиций являются известными в области техники настоящего изобретения и описаны в REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, выше, на страницах 780-820. Парентеральные составы могут поставляться в жидкой композиции или в виде твердого веществ-

ва, которое будет смешиваться со стерильной инъекционной средой непосредственно перед введением. В особенно предпочтительном варианте осуществления парентеральные составы поставляют в единичной дозированной форме для простоты введения и однородности дозировки.

ФСГ, ХГЧ и/или ЛГ, которые могут быть составлены согласно настоящему изобретению, могут быть получены традиционными средствами из мочи, как хорошо известно в области техники настоящего изобретения, или могут быть получены рекомбинантно. По возможным способам получения дополнительно приводится ссылка, например, на WO 2009/127826.

Одним предпочтительным вариантом осуществления изобретения является описанная в настоящем документе композиция, содержащая ХГЧ.

ХГЧ может быть получен любыми средствами, известными в области техники настоящего изобретения. ХГЧ, как используют в описании настоящего изобретения, включает выделенный из мочи ХГЧ и рекомбинантный ХГЧ. Композиция, содержащая выделенный из мочи ХГЧ, является особенно предпочтительной. Композиция, имеющая активность ЛГ, который - по меньшей мере частично - является производным из ХГЧ (иначе говоря: ХГЧ является молекулой, которая является ответственной за эту активность ЛГ), также является охваченной. Полученный из человека ХГЧ может быть очищен из любого соответствующего источника (например, мочи и/или плаценты) любым способом, известным в области техники настоящего изобретения. Способы экспрессии и очистки рекомбинантного ХГЧ хорошо известны в области техники настоящего изобретения.

ЛГ может быть получен любыми средствами, известными в области техники настоящего изобретения. ЛГ, как используют в описании настоящего изобретения, включает полученный от человека ЛГ и рекомбинантный ЛГ. Полученный от человека ЛГ может быть очищен из любого соответствующего источника (например, мочи) любым способом, известным в области техники настоящего изобретения. Способы экспрессии и очистки рекомбинантного ЛГ являются известными в области техники настоящего изобретения.

Термин "фармацевтический состав" используют в описании настоящего изобретения взаимозаменяемо с термином "фармацевтическая композиция".

Стабильная фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может применяться для лечения бесплодия. "Лечение бесплодия" в контексте настоящего изобретения включает лечение бесплодия посредством контролируемой (гипер)стимуляции яичника (COS) или способы, которые включают стадию или этап контролируемой стимуляции яичников, например внутриматочное осеменение (IUI), оплодотворение *in vitro* (IVF) или интраплазматическое введение спермы (ICSI). Термин также включает индукцию овуляции (OI) или способы, которые включают стадию или этап индукции овуляции. Термин также включает лечение бесплодия у субъекта, имеющего трубное или необъяснимое бесплодие, включая лечение бесплодия у субъекта, имеющего эндометриоз, например стадию I или стадию II эндометриоза (определенную в соответствии с системой классификации Американского общества репродуктивной медицины (ASRM) для различных стадий эндометриоза), пересмотренной классификации эндометриоза Американского общества репродуктивной медицины: 1996, *Fertil Steril* 1997; 67, 817-821), и/или у субъекта с партнером, имеющим мужской фактор бесплодия. Термин предпочтительно включает применение, например, при вспомогательных репродуктивных технологиях (ART), индукции овуляции (OI) или внутриматочном осеменении (IUI).

Фармацевтический состав может применяться, например, при медицинских назначениях, где применяются известные препараты ФСГ или препараты ФСГ и ХГЧ. В типичном варианте осуществления композицию согласно настоящему изобретению применяют при таких же медицинских назначениях, которые являются разрешенными для Менопур® в Европе, как приведено ниже для типового случая.

Лечение женского и мужского бесплодия.

Ановуляторные женщины: Менопур может применяться для стимуляции развития фолликул у аменорейных пациентов. Кломифен (или аналогичное средство, индуцирующее овуляцию, которое воздействует на стероидные механизмы обратной связи) является предпочтительной терапией для женщин с различными нарушениями менструального цикла, включающими недостаточность лютеиновой фазы с ановуляторными циклами и с нормальным пролактином, а также пациентов с аменореей с явными признаками выработки эндогенных эстрогенов, но нормальным пролактином и нормальными уровнями гонадотропина. Пациенты без лечебного эффекта могут затем быть выбраны для терапии менотропинами.

Женщины, которым проводят суперовуляцию в рамках программы искусственного оплодотворения: Менопур может применяться для индукции развития множественных фолликулов у пациентов, для которых выполняют технологию искусственного оплодотворения, такую как оплодотворение *in vitro* (IVF).

Гипогонадотропный гипогонадизм у мужчин: Менопур может назначаться в комбинации с хорионгонадотропином человека (например, Хорагоном) для стимуляции сперматогенеза или назначения, разрешенные для Менопур® в США, как следующее:

Развитие множественных фолликул и беременность у овулирующих женщин в качестве части цикла вспомогательной репродуктивной технологии (ART).

Альтернативно, варианты лечения с использованием Менопур® могут быть описаны следующим образом:

Менопур назначают для лечения бесплодия в следующих клинических ситуациях:

Ановуляция, включающая болезнь поликистозных яичников (PCOD) у женщин, которые оказались невосприимчивыми к лечению цитратом кломифена.

Контролируемая гиперстимуляция яичника для индукции развития множественных фолликулов для вспомогательных репродуктивных технологий (ART) (например, оплодотворение/перенос эмбриона (IVF/ET) *in vitro*, перенос гамет в маточную трубу (GIFT) и интроплазматическое введение спермы (ICSI)).

Стимуляция развития фолликулов у женщин с гипогонадотропным гипогонадизмом.

Настоящее изобретение также предоставляет применения стабилизированных композиций гонадотропина, описанных в раскрытии настоящего изобретения (согласно аспектам изобретения) для производства или в производстве лекарственного препарата для лечения бесплодия.

В предпочтительном варианте осуществления композицию согласно настоящему изобретению применяют для индукции овуляции, вспомогательных репродуктивных технологий (ART) и/или в случае гипогонадотропного гипогонадизма у мужчин.

Фармацевтические составы могут быть дополнительно составлены в хорошо известные композиции для любого пути введения лекарственного средства, например перорального, ректального, парентерального, трансдермального (например, технологии с использованием пластырей), внутривенного, внутримышечного, подкожного, интрацистернального, интравагинального, внутрибрюшинного, местного (порошки, мази или капли) или в виде буккального или назального спрея. Типовая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, такой как водный раствор, нетоксичные эксципиенты, включающие соли и консерванты, буферы и т.п., описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences fifteenth edition (Matt Publishing Company, 1975), на страницах 1405-1412 и 1461-87; и USP-NF, National Formulary XIV fourteenth edition (American Pharmaceutical Association, 1975), среди прочих. Настоящее изобретение в некоторых вариантах осуществления направлено на конкретное обеспечение композиции, которая проявляет как неожиданно высокую стабильность, так и дополнительные преимущества, как отсутствие неприемлемого окрашивания, отсутствие неприемлемой мутности, сниженная боль или отсутствие боли при инъекции и сниженное раздражение или отсутствие раздражения кожи при инъекции. Это стало возможным только с использованием результатов настоящего изобретения, которое показывает, что конкретные компоненты обеспечивают преимущественные характеристики и высокую стабильность жидких композиций гонадотропина, описанных в настоящем документе.

Несмотря на то, что композиции гонадотропина представлены на рынке в течение нескольких десятилетий, специалист в области композиций хорошо осведомлен, что композиция этих белков ассоциируется с рядом трудностей. Эти трудности существуют и сильно видоизменяются на в результате действия многих факторов, таких как:

тот факт, что белок вводят в состав (белки сами по себе трудно составлять в любом случае);

тот факт, что белок является специфически гликозилированным (на гликозилирование может оказывать влияние конкретный выбор технологии получения и эксципиентов);

составленные конкретные белок (белки) (химический состав композиции значительно изменяется в зависимости от действительного белка: было показано, например, что даже близкородственные белки, такие как ФСГ и ХГЧ имеют различное поведение в одной и той же композиции, см., например, WO 2012/013742);

был ли белок получен или не был получен из природного объекта, например, мочи, или продуцирован рекомбинантно;

необходим ли консервант (некоторые консерванты выполняют их предназначенную задачу защиты против микробиального роста, но оказывают отрицательное воздействие на стабильность конечной композиции. Это актуально для всех из м-крезола, фенола и бензилового спирта (с хлоридом бензалкония или без него), которые в настоящее время являются единственными консервантами, разрешенными для применения вместе с гонадотропинами; кроме того, консерванты могут оказывать отрицательный эффект на окрашивание, в зависимости от дополнительных эксципиентов и активного ингредиента, содержащихся в композиции);

применяемый конкретный поверхностно-активный агент (они могут в некоторых случаях приводить к мутности, что также зависит от дополнительных эксципиентов, содержащихся в соответствующей композиции);

применяемый конкретный буфер (например, цитратный буфер будет часто приводить к боли и раздражению кожи при инъекции);

конкретные эксципиенты, применяемые для стабилизации, которые будут стабилизировать различные составы непредсказуемым образом;

в зависимости от эксципиента, применяемого для стабилизации, которые будут стабилизировать различные составы непредсказуемым образом.

Таким образом, специалист в области композиций сталкивается с рядом множества проблем с одной стороны и рядом возможных эксципентов с другой стороны, что приводит к сложной проблеме предоставления композиции с хорошей стабильностью, с одной стороны и отсутствием окрашивания или мутности или боли при инъекции, с другой стороны.

Следовательно, совершенно неожиданным оказалось, что комбинация аргинина и метионина согласно настоящему изобретению без добавления буфера решала эти конкретные проблемы в представленном интервале рН.

В этой связи фразы "без (добавления/дополнительного) буфера" и "не содержит буфер" используют синонимично в данном описании. Это выражение будет означать, что в композиции не добавляю/присутствует никакого дополнительного соединения, которое могло бы считаться имеющим буферную емкость. Раствор рассматривают как забуференный, если он будет устойчивым к изменениям ионной активности при добавлении веществ, которые, как ожидается, изменяют активность таких ионов. Буферы представляют собой вещества или комбинации веществ, которые придают такую устойчивость раствору. Забуференные растворы являются системами, в которых ионы находятся в равновесии с веществами, способными к удалению или высвобождению ионов. Это относится к количеству материала, которое может быть добавлено к раствору, не вызывая значительного изменения ионной активности. Его определяют как отношение добавленных кислоты или основания (в грамм-эквивалентах/л) к изменению единиц рН. Емкость забуференного раствора регулируют для условий применения, обычно посредством доведения концентраций буферных веществ (USP NF). Буферную емкость обычно выражают как число эквивалентов (Экв) сильной кислоты (например, HCl) или основания (например, NaOH) которое в одном литре рассматриваемого раствора вызывает изменение рН на одну единицу (предпочтительно при одной атмосфере и 21°C) (Skoog West and Holler, Fundamentals of Analytical Chemistry, пятое издание). Один эквивалент HCl равен одному молю HCl, а один эквивалент NaOH равен одному молю NaOH. В настоящем изобретении буферная емкость будет выражена как число эквивалентов (Экв.) сильной кислоты (например, HCl) или основания (например, NaOH), которое в 1 л рассматриваемого раствора вызывает изменение рН на одну единицу. Таким образом, согласно настоящему изобретению, композиция не будет содержать дополнительного буфера, который добавляет >0,5 мЭкв/(л×рН) (предпочтительно при 1 атм, 21°C) в интервале рН, раскрытом для композиций согласно настоящему изобретению. Метод определения и расчета буферной емкости

Буферную емкость можно определить и рассчитать следующим образом.

Определенный объем раствора, подлежащего тестированию, титруют с использованием кислоты, например HCl, или основания, например NaOH.

Должны применяться подходящие концентрации кислоты и основания, например 0,2н., чтобы осуществить достаточно точное титрование.

Титрование выполняют посредством добавления небольших аликвот HCl или NaOH к тестируемому раствору. Для каждого добавления добавленный объем и соответствующий рН документально фиксируют.

Накопленный объем кислоты и основания наносят на график в зависимости от измеренного рН, см., например, фиг. 1.

Линейную регрессию с аппроксимацией по методу наименьших квадратов осуществляют для соответствующей области рН и рассчитывают  $R^2$  для подтверждения соответствия подобранной кривой.

Буферную емкость, выраженную в мЭкв/(литр×единиц рН) рассчитывают методом линейной регрессии.

Уравнение 1:

$$Y = ax + b \Leftrightarrow x = \frac{Y - b}{a}$$

где x - буферная емкость [мкл 0,2н. HCl/NaOH для смещения рН на 1 единицу];

Y-b=1 - единица рН;

a - угол наклона.

Уравнение 2:

$$x = \frac{(Y - b) \times C}{a \times V \times 10^6}$$

где мЭкв соответствует миллиэквивалентам кислоты или основания, полученным, исходя из концентрации, например, 0,2н. HCl/NaOH, которые равны 0,2 эквивалентам/л HCl/NaOH, которые равны 200 мЭкв/л HCl/NaOH;

x - буферная емкость [мЭкв/(л×единиц рН)];

Y-b=1 - единица рН;

C - концентрация кислоты или основания, например, для HCl/NaOH [ммоль/л=мЭкв/л];

V - объем рассматриваемого раствора;

$10^6$  - фактор коррекции от мкл до литра.

Пример расчета, используя Уравнение 2 и партию С-01 в интервале рН 6,564-6,947 из табл. 9:

$$x = \frac{1 \times 200}{0,001507 \times 0,1 \times 1000000} = 1,32 \text{ мЭкв/литр} \times \text{единиц рН}$$

Чтобы определить, будет ли компонент добавлять >0,5 мЭкв/(литр×единиц рН) к буферной емкости, буферную емкость определяют, как описано выше для раствора с компонентом и для того же самого раствора без компонента. Различие в определенной буферной емкости для двух растворов дает добавление данного компонента к буферной емкости.

Выражения "без (добавления/дополнительного) буфера" и "не содержит буфер" также означают, что композиция согласно настоящему изобретению не содержит какой-либо один из следующих буферов, (которые являются буферами, разрешенными FDA для парентерального применения в интервале рН 6,0-7,5):

- гистидин,
- фосфат,
- цитрат,
- триметамин (Трис),
- гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES),
- карбонат.

Кроме того, эти выражения также означают, что не включен ни один из дополнительных разрешенных FDA буферов для парентерального применения, в частности:

- ацетат,
- адипиновая кислота,
- сульфат аммония,
- сукцинат,
- аспарагин,
- аспарагиновая кислота,
- глутамат (глутаминовая кислота),
- глицин,
- лактат,
- лизин,
- малеат (малеиновая кислота),
- фумарат (фумаровая кислота),
- малат,
- меглумин,
- пропионат,
- аланин,
- фенилаланин,
- цистеин,
- изолейцин,
- лейцин,
- пролин,
- серин,
- тартрат,
- треонин,
- триптофан,
- тирозин,
- валин.

Под фразой "без добавления буфера" обычно принимают, что рН конечного раствора не может легко поддерживаться в желательном интервале (и будет с трудом достигать конкретного целевого рН во время регулирования) (в настоящем изобретении рН должен находиться между 6,0 и 7,5, более предпочтительно между 6,5 и 7,4, предпочтительно при или около 6,8), но будет сильно колебаться.

Крайне важным является поддерживать корректный рН для фармацевтического продукта. рН определяет параметры, такие как стабильность, активность и срок хранения. По этой причине фармацевтические композиции обычно составляют вместе с буфером. Доступными являются различные буферные агенты, их выбирают, чтобы обеспечить эффективность при желательном рН.

Иллюстративными буферами, которые используют постоянно практически во всех существующих композициях гонадотропина, являются фосфатный буфер и цитратный буфер. Буфер необходим для обеспечения композиции с поддерживаемым рН в диапазоне условий, воздействию которых композиция может быть подвергнута во время составления и, в частности, во время ее хранения. Часто является очень проблематичным найти такой подходящий буфер, и затем в некоторых случаях эффективный буфер обеспечивает композицию с нежелательными побочными эффектами, таким как боль при инъекции для цитратных буферов. Все буферы имеют характерный недостаток, будучи дополнительным ингреди-

ентом в композиции, который осложняет процесс составления, создает риск вредного воздействия на другие ингредиенты, стабильность, срок хранения приемлемость для конечного пользователя.

Авторы настоящего изобретения, однако, неожиданно обеспечили композиции, где никакой буфер не присутствует, в то время как композиции не испытывают отрицательного воздействия от какого-либо неприемлемого колебания рН. Композиции содержат аргинин в качестве стабилизирующего соединения. Аргинин мог бы обладать ожидаемой забуферивающей емкостью, равной  $\pm 1$  единицу рН около его рКа, которые находятся при 2,17, при 12,5 и при 9,04. Таким образом, никакой забуферивающей емкости не ожидают в предпочтительном интервале рН настоящего изобретения (например, между 6,0 и 7,5, более предпочтительно между 6,5 и 7,4, предпочтительно при или около 6,8). Тем не менее, неожиданно было обнаружено, что аргинин обладает сильным стабилизирующим влиянием на рН в конкретных композициях, описанных в настоящем документе. Ни один такой эффект аргинина не был описан где-либо в предшествующем уровне техники.

Предпочтительно обеспечение этой композиции без буфера, как определено в описании настоящего изобретения, также предоставляет композицию, приводящую к сниженной боли или отсутствию боли при инъекции и снижению раздражению кожи или отсутствию раздражения кожи при инъекции. Это отличает ее от композиций, в которых применяют, например, цитратный буфер, который, как было показано, приводит к раздражению кожи и боли при инъекции.

Аргинин в настоящем изобретении может представлять собой аргинин или может являться аргинином HCl или даже более предпочтительно, L-аргинином (HCl). Количество аргинина предпочтительно находится в интервале между 50 и 160 мМ, более предпочтительно 80-160 мМ, даже более предпочтительно при прил. 150 мМ.

Как можно видеть из примеров, приведенных ниже, аргинин обладает выраженным эффектом на окисление на ФСГ и ХГЧ. Однако авторы изобретения продемонстрировали особенно высокий стабилизирующий эффект. Довольно неожиданно затем они смогли предоставить жидкую композицию гонадотропина, которая была стабильной и показала лишь минимальное окисление (на приемлемых уровнях, см. раздел примеров ниже), если гонадотропин комбинировали с высоким стабилизирующим количеством аргинина (например, 150 мМ).

Этот результат был особенно неожиданным, так как эффект был получен в интервале рН, удаленным далеко от значений рКа аргинина, а именно в интервале рН от рН 6,0 до 7,5. Этот интервал является предпочтительным интервалом рН для настоящего изобретения. В особенно предпочтительном варианте осуществления рН находится в интервале от 6,5 до 7,4. Даже более предпочтительным является интервал рН между 6,5 и 7,2. Наиболее предпочтительным является рН, равный  $6,8 \pm 0,3$ .

Неожиданно, низкое антиоксидантное количество метионина, предпочтительно L-метионина, могло предотвратить нежелательные события окисления. Это низкое количество могло быть настолько низким, как 0,05 мг/мл, но могло доходить до 2,5 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество метионина составляет между 0,1 и 1,5 мг/мл. В даже более предпочтительном варианте осуществления количество метионина составляет между 0,1 и 1 мг/мл. В даже более предпочтительном варианте осуществления количество метионина находится между 0,1 и 0,5 мг/мл. Наиболее предпочтительным вариантом осуществления является метионин при 0,15 мг/мл. Совсем нельзя было предсказать, что высокой окислительной способности аргинина могло противодействовать такое низкое количество метионина и преодолеть ее.

Дополнительно, еще неожиданным было установление того, что аргинин обладал гораздо более выраженным стабилизирующим эффектом, чем другие известные стабилизирующие агенты, например сахара, которая является довольно часто добавляемым и очень хорошо установленным стабилизатором.

Композиции могут включать подходящие водные и неводные фармацевтические носители, разбавители, растворители и/или несущие среды. Примеры подходящих водных и неводных фармацевтических носителей, разбавителей, растворителей и/или несущих сред включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), карбоксиметилцеллюлозу и их подходящие смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат.

Дополнительно предпочтительным, особенно для многодозовых композиций, в настоящем изобретении является добавление консерванта. Очень предпочтительно, когда этим консервантом является фенол. В дополнительно предпочтительном варианте осуществления фенол добавляют при концентрации от 4,0 до 6,0 мг/мл, предпочтительно 5,0 мг/мл фенола. Неожиданно, фенол также является преимущественным в контексте конкретной композиции согласно настоящему изобретению в сравнении с другими хорошо известными консервантами, в том, что он не приводит к окрашиванию и является очень стабильным, даже в течение продолжительного периода времени, несмотря на присутствие этого консерванта, как показано в разделе примеров.

Дополнительно предпочтительным в настоящем изобретении является добавление поверхностно-активного агента. Очень предпочтительным таким поверхностно-активным веществом является полисорбат, даже более предпочтительно полисорбат 20. В дополнительном предпочтительном варианте

осуществления полисорбат 20 добавляют при концентрации 0,001-0,05 мг/мл, предпочтительно 0,005 мг/мл полисорбата 20. Предпочтительно композиция согласно настоящему изобретению, составленная вместе с полисорбатом 20, не приводит к появлению мутности и является очень стабильной, даже в течение продолжительного периода времени, несмотря на присутствие этого консерванта, как показано в разделе примеров.

Композиции могут также содержать дополнительные добавки, кроме тех, что уже перечислены выше, такие как, но не ограниченные ими, (дополнительные) консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергаторы. Антибактериальные и противогрибковые средства могут быть включены для предотвращения роста микробов, и они включают, например, парабены, хлорбутанол, фенолы, сорбиновую кислоту и т.п. Кроме того, может быть желательным включать регуляторы тоничности. Композиция согласно настоящему изобретению, однако, не содержит дополнительного буфера.

В некоторых случаях, чтобы оказывать пролонгированное действие, желательно замедлять всасывание гонадотропина (гонадотропинов), такого как ФСГ (и других активных ингредиентов, если они присутствуют) после подкожной или внутримышечной инъекции. Это можно выполнять посредством применения жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала с плохой растворимостью в воде. Скорость всасывания тогда зависит от скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. Альтернативно, замедленное всасывание парентерально вводимой комбинационной формы ФСГ осуществляют посредством растворения или суспендирования комбинации в масляной несущей среде.

Согласно настоящему изобретению авторы настоящего изобретения сделали попытку исследовать эффект некоторых соединений на стабильность жидкой композиции гонадотропина; также исследовали стабилизирующий, а также дестабилизирующий эффекты нескольких соединений. Дополнительно, авторы изобретения искали способ улучшить полученную в результате композицию с позиций ее прозрачности, степени окрашивания и боли при инъекции.

Термин "стабильность" может относиться к химической стабильности, включающей ковалентную модификацию в аминокислотной последовательности, но в контексте стабильности белка он может также относиться к физической стабильности, которая включает изменения складчатого состояния белка (т.е. нативного состояния), не включающие расщепление ковалентных связей.

В настоящем изобретении термин "стабильность" относится к биологической стабильности композиций гонадотропинов, в частности ФСГ и ХГЧ. Физическая нестабильность белковой композиции может быть вызвана агрегацией молекул белка с образованием агрегатов более высокого порядка посредством диссоциации гетеродимеров на мономеры или посредством любого другого конформационного изменения, которое снижает по меньшей мере одну биологическую активность, например, белков ФСГ (и других активных ингредиентов, если они присутствуют), включенных в настоящее изобретение.

"Стабильный" раствор или композиция представляет собой раствор или композицию, где степень агрегации, диссоциации, конформационной модификации, потери биологической активности и т.п. содержащихся белков контролируется приемлемым образом и не увеличивается неприемлемо с течением времени. Стабильность можно оценить методами, хорошо известными в области техники настоящего изобретения, включающими измерение светорассеяния образца, визуальную проверку прозрачности и/или окрашивания, измерение поглощения или оптической плотности, определения размера молекул (например, посредством эксклюзионной хроматографии или проточного фракционирования в силовом поле), оценку биологической активности *in vitro* или *in vivo* и/или проведение дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

Композиция настоящего изобретения является стабильной в течение 12 месяцев при условиях хранения, предпочтительно 16 месяцев при условиях хранения, даже более предпочтительно в течение 24 месяцев, даже более предпочтительно в течение 24 месяцев при условиях хранения плюс 1 месяц "в процессе использования", т.е. при комнатной температуре. Стабильность при "условиях хранения" относится к хранению композиции в охлаждаемом окружении, например при  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ . "Комнатная температура" в настоящем контексте означает температуру при или ниже  $30^{\circ}\text{C}$ , предпочтительно  $15-25^{\circ}\text{C}$ , предпочтительно  $18-25^{\circ}\text{C}$ , наиболее предпочтительно  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Для определения стабильности в контексте композиции согласно настоящему изобретению применяли хорошо известные (иммунологические) аналитические тесты для ФСГ и ХГЧ, которые являются хорошо известными специалисту в области техники настоящего изобретения и, следовательно, описаны в настоящем раскрытии только в общем виде следующим образом.

ОФ-ВЭЖХ для исследования окисления.

Окисление белков определяли посредством ОФ-ВЭЖХ, при градиентном элюировании на колонке С4 и УФ-детектировании при 210 нм.

Фермент-связанный флуоресцентный анализ (ELFA).

Иммунную активность ФСГ и ХГЧ определяли в иммунологическом сэндвич-анализе, проводимом с использованием автоматического анализатора прибора VIDAS® (BioMerieux, Франция) с наборами VIDAS®, соответствующими ФСГ и ХГЧ соответственно.

Эксклюзионная хроматография (SEC).

Чистоту рФСГ определяли с использованием эксклюзионной хроматографии (SEC) на колонке SEC с интервалом молекулярных масс белка 3-70 кДа и УФ-детектированием при 210 нм.

Хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC).

Чистоту рХГЧ определяли с использованием хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC) при градиентном элюировании на колонке с алкиламидными группами и УФ-детектированием при 220 нм.

Метод биологического анализа ФСГ и ЛГ.

Активность ФСГ и ЛГ определяли, используя биологические анализы *in vivo*; Стилман-Поли (ФСГ) и анализ прироста массы семенных пузырьков (ЛГ) соответственно.

Другие методы оценки стабильности являются хорошо известными в области техники настоящего изобретения и также могут применяться согласно настоящему изобретению.

Анализы на активность ФСГ и ЛГ стандартизованы с использованием Четвертого Международного Стандарта для мочевого ФСГ и мочевого ЛГ, Ноябрь 2000, от Экспертной комиссии по биологической стандартизации от Всемирной Организации Здравоохранения (WHO ECBS) и являются хорошо известными специалисту в области техники настоящего изобретения.

Известно, что некоторые консерванты обладают выраженным дестабилизирующим эффектом на композиции гонадотропина, и было неожиданно установлено, что такая описанная композиция согласно настоящему изобретению, в частности, содержащая аргинин и метионин, но не буфер, является особенно стабильной - даже в течение продолжительного периода времени и даже в присутствии фенола.

Заявленная в настоящем изобретении комбинация аргинина и метионина обладает стабилизирующим эффектом на жидкую композицию МГЧ, который преимущественным и неожиданным образом является даже более выраженным, чем стабилизирующие эффекты известных стабилизаторов, таких как, например, сахароза. Улучшенный эффект стабилизации в сравнении с известными стабилизаторами, такими как сахароза, является особенно удивительным. Кроме того, довольно неожиданный стабилизирующий эффект комбинации настоящего изобретения был выраженным, несмотря на отсутствие буфера.

Из предшествующего уровня техники известно, что существует разрушение ФСГ, происходящее в фармацевтических композициях ФСГ, и это подтверждено примерами, представленными в WO 2012/013742. ФСГ будет разрушаться как в зависимости от времени, а также в зависимости от температуры.

По-видимому, конформационное разворачивание третичных и вторичных структур ФСГ, происходящее при нагреве, представляет собой переход между двумя состояниями (когда агрегация белка ограничена). Это разворачивание может быть независимым от диссоциации субъединиц (изменений четвертичной структуры).

Кроме того, из предшествующего уровня техники становится понятным, что ФСГ, содержащий консервант, такой как бензиловый спирт или фенол, где такие консерванты необходимы, например, в качестве антимикробных средств в жидких композициях ФСГ, очевидно воздействует на стабильность многодозовых композиций ФСГ отрицательным образом. В этом случае долговременная стабильность ФСГ уменьшается, температура денатурации ФСГ понижается, и уже денатурированные формы имеют более низкий уровень вторичных структур, чем в композициях ФСГ, не содержащих консервантов.

Настоящее изобретение также относится к способу стабилизации жидкой композиции гонадотропина, где способ включает стадию добавления аргинина и метионина к указанной композиции, которая не содержит буфер.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1: Кривая титрования. Угол наклона кривых показывает буферную емкость, например, крутой угол наклона отображает низкую буферную емкость.

Фиг. 2: Оптимизатор ответа, основанный на результатах при 25°C. Вертикальные линии показывают уровень L-аргинина и L-метионина и ответы при иммунологическом анализе ФСГ и ХГЧ в виде Y (в МЕ/мл).  $R^2_{ХГЧ}$ : 92,15% и  $R^2_{ФСГ}$ : 67,31%.

Все исследования были подтверждены дополнительно полученными данными в режиме реального времени.

#### Примеры

Пример 1.

1. Предшествующий уровень и введение.

При лечении бесплодия применяют некоторые различные лекарственные продукты, содержащие гормоны гонадотропина, выделенные из мочи постменопаузальных или беременных женщин, такие как препараты МГЧ (менопаузального гонадотропина человека). МГЧ обладает активностью фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ), находящихся в отношении один к одному.

ФСГ, ЛГ и хорионгонадотропин человека (ХГЧ) принадлежат к гонадотропному семейству сложных гликопротеиновых гормонов. Они являются гетеродимерами, составленными из  $\alpha$ - и

$\beta$ -субъединиц.  $\alpha$ -Субъединица из 92 аминокислот является общей для этих трех гонадотропинов,  $\beta$ -субъединицы являются уникальными, придавая им различные биологические характеристики (Wolfenson C. et al., 2005, Batch-to-batch consistency of human-derived gonadotropin preparations compared with recombinant preparations).

Reproductive BioMedicine. Vol 10 No. 4:442-454; Shen, S.T., Cheng, Y.S., Shen, T.Y. и Yu, J.Y., 2006, Molecular cloning of follicle-stimulating hormone (FSH)-beta subunit cDNA from duck pituitary. Gen. Comp Endocrinol. 148:388-394; Fox, K.M., Dias, J.A., и Van, R.P., 2001, Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. Mol. Endocrinol. 15:378-389; Burova, T., Lecompte, F., Galet, C, Monsallier, F., Delpech, S., Haertle, T., and Combarnous, Y. 2001, Conformational stability and in vitro bioactivity of porcine luteinizing hormone. Mol. Cell Endocrinol. 176:129-134. Все гликопротеиновые гормоны теряют их биологическую активность при диссоциации нековалентно связанных субъединиц (Alevizaki, M. and Huhtaniemi, I. 2002, Structure-function relationships of glycoprotein hormones; lessons from mutations и polymorphisms of thyrotrophin и gonadotropin subunit genes. Hormones. (Athens.) 1:224-232).

ЛГ и ХГЧ связываются с одним и тем же рецептором, и, следовательно, оба обладают активностью ЛГ. В МГЧ активность ЛГ происходит в основном из ХГЧ.

Целью настоящего изобретения являются разработать композицию гонадотропина в виде жидкой композиции для подкожной инъекции. Для многодозовой инъекции обычно необходимо добавление консерванта (Meyer, B.K., Ni, A., Hu, B., and Shi, L. 2007, Antimicrobial preservative use in parenteral products: past и present. J. Pharm. Sci. 96:3155-3167; Chang, B. S. and Hershenson, S. Practical Approaches to Protein Formulation Development. In Rational Design of Stable Protein Formulations. J.F. Carpenter и M.C. Manning, editors. 2002, Plenum Publ., New York. 1-25; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. 2000, CRC Press, Boca Raton).

Поскольку, как правило, нативная (биоактивная) структура белков является очень чувствительной по отношению к ее окружению, например составу композиции, системам контейнер/укупорка, и трудно подобрать pH и температуру для идентификации подходящей жидкой композиции для гонадотропинов, проводили скрининг различных эксципиентов. В работе над настоящим изобретением буферную емкость и стабильность в режиме реального времени для различных композиций МГЧ исследовали, применяя иммунологический анализ ФСГ, иммунологический анализ ХГЧ, метод биологического анализа, ОФ-ВЭЖХ для определения окисленных белков, титрования и pH, как подробно описано ниже.

## 2. Исследуемый продукт.

### 2.1. Материалы.

#### 2.1.1. Лекарственное вещество (ЛВ).

Лекарственное вещество (ЛВ) МГЧ-НР было произведено Instituto Massone S.A., Аргентина. ЛВ МГЧ-НР получают в виде порошка от Ferring Pharmaceuticals A/S, Копенгаген, Дания.

Определение биологической активности ФСГ и ЛГ в лекарственном веществе проводили в соответствии с используемой в настоящее время версией Британской Фармакопеи (ВР). При желании, также возможно выполнять это определение в соответствии с версией 35 USP. Биологическая активность ФСГ:ЛГ в МГЧ составляет 1:1, и, следовательно, для составления лекарственного продукта применяют среднюю определенную биологическую активность ФСГ и ЛГ. Таким образом, когда концентрация МГЧ приведена, например, как 625 МЕ/мл, она соответствует биологической активности, равной 625 МЕ/мл ФСГ и 625 МЕ/мл ЛГ.

#### 2.1.2. Эксципиенты.

Перечень эксципиентов, применяемых в данной работе, описан в табл. 1.

Таблица 1. Список эксципиентов.

Наименование	Качество	Производитель
Гранулы натрия гидроксида	Фарм. Eur, ВР, JP, NF	Merck
Хлористоводородная кислота, дымящаяся 37%	Фарм. Eur, ВР, JP, NF	Merck
Лимонная кислота, моногидрат	Фарм. Eur, ВР, JPE, USP	Merck

Ортофосфорная кислота 85%	Фарм. Eur, BP, JPE, NF	Merck
Дигидрат тринатрийцитрата	Фарм. Eur, BP, JPE, USP	Merck
Додекагидрат динатрийгидрофосфата	Фарм. Eur, BP, JPE, USP	Merck
L-гистидин	EMPROVE® эксп. Фарм. Eur, USP	Merck
L-метионин	USP,	J.T. Baker мультикомпедиальный
L-аргинин	Фарм. Eur, USP	Merck
L-аргинина моногидрохлорид	Pharma Grade, EP, JP, USP	Sigma-Aldrich
Сахароза	EMPROVE® эксп. Ph. Eur, BP, JPE, NF	Merck
D-(+)-трегалозы дегидрат	≥99%, cGMP	Sigma-Aldrich
Маннитол	EMPROVE® Фарм. Eur, BP, USP, JPE	Merck
Лактозы моногидрат	Фарм. Eur, BP, NF, JP	Merck
Глицин	EMPROVE® Фарм. Eur., BP, JPE, USP	Merck
Хлорид натрия	EMPROVE, Фарм. Eur., BP, USP	Merck
Полисорбат 20	Фарм. Eur, NF, JPE	J.T. Baker
Полоксамер 188	Пригодный для био. Фарм. производства, Ph.Eur., NF	Merck
Фенол	Фарм. Eur, JP, USP	Merck
Мета-крезол	Фарм. Eur./USP для парентерального введения	Hedingger
Вода Milli-Q	-	Millipore

Система укупорки контейнера.

Для исследований стабильности материалы первичной упаковки представляли собой стеклянные флаконы с каучуковыми пробками и алюминиевыми/пластиковыми крышками или стеклянные картриджи с каучуковыми плунжерами и обжимными крышками.

### 3. Технология производства.

#### 3.1. Составление.

Все композиции производят в лабораторном масштабе.

Для составления раствора лекарственного продукта (ЛП) исходные растворы каждого эксципиента и лекарственного вещества (ЛВ) последовательно смешивают. Перед добавлением МГЧ и окончательным разведением до объема, рН каждой композиции регулируют при необходимости. Исходные растворы всех эксципиентов и МГЧ получают в воде Milli-Q.

#### 3.2. Стерильная фильтрация и асептическое заполнение.

Композиции для исследования на стабильность фильтруют в стерильных условиях с использованием фильтра Millipore PVDF 0,22 мкм. Стерильную фильтрацию проводят в ламинар-боксе, используя автоклавированные материалы.

Заполнение выполняют после фильтрации. Контейнеры заполняют раствором образца. Все флаконы и картриджи заполняют в условиях, подобных асептическим, в ламинар-боксе и немедленно закрывают каучуковыми пробками или обжимными крышками. Вне ламинар-боксы заполненные флаконы герметично закрывают алюминиевыми развальцованными колпачками.

#### 4. Условия хранения.

##### 4.1. Условия хранения.

Контейнеры, содержащие композиции лекарственного продукта хранят в условиях ускоренного хранения в течение до 3 месяцев при  $30 \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\%$  ОВ и/или в течение до минимально 6 месяцев при  $25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$  ОВ. При каждой температуре хранения контейнеры хранят в вертикальных положениях. Картриджи хранят горизонтально. Все контейнеры защищают от воздействия света.

##### 5. Аналитические методы.

Аналитические методы, применяемые в исследованиях, описаны ниже.

##### 5.1. Методика титрования.

В соответствии с USP-NF, как описано ранее, раствор считают забуференным, если он является устойчивым к изменениям активности ионов при добавлении веществ, которые, как ожидается, изменяют активность таких ионов. Буферы представляют собой вещества или комбинации веществ, которые придают эту устойчивость раствору. Забуференные растворы являются системами, в которых ионы находятся в равновесии с веществами, способными к удалению или высвобождению ионов. Термин "буферная емкость" относится к количеству вещества, которое может добавляться к раствору, не вызывая существенного изменения активности ионов. Ее определяют как отношение добавленных кислоты или основания (в грамм-эквивалентах/л) для изменения единицы рН. Емкость забуференного раствора регулируют для условий применения, обычно посредством регулирования концентраций буферных веществ.

Буферную емкость общепринято выражают как число эквивалентов (Экв) сильной кислоты или основания, которое вызывает в одном литре рассматриваемого раствора изменение на одну единицу рН с получением единиц мЭкв/(литр×рН), которые применяют для определения буферной емкости в настоящем изобретении. Это означает, что буферную емкость определяют как число молей (эквивалентов) Н<sup>+</sup>/ОН<sup>-</sup> необходимое для изменения рН 1 л буферного раствора на одну единицу.

Буферную емкость определяли, используя композицию плацебо (плацебо в настоящем описании относится к композициям без активного ингредиента), регулируемую до целевого рН в качестве исходной отметки. 0,2н. NaOH/HCl применяли для титрования рН вверх или вниз. рН измеряли после каждого добавления 0,2н. NaOH/HCl и объем 0,2н. NaOH/HCl фиксировали документально. Количество 0,2н. NaOH/HCl наносили на график в виде значений по оси X, а рН наносили на график в виде значений по оси Y. Аппроксимированную линейную регрессию проводили около рН 6,8 для плацебо МГЧ (целевое рН) и около рН 6,5 для эталонного плацебо (целевое рН). Буферная емкость может быть рассчитана как мкл 0,2н. HCl/NaOH для смещения рН на 0,01 единицы рН/л ЛП и как миллиэквиваленты (мЭкв) кислоты или основания/(литр×единица рН), как описано выше при определении.

##### 5.2. Иммунологический анализ ФСГ и ХГЧ.

Иммунологический анализ ФСГ и ХГЧ определяли посредством сэндвич-ELFA.

##### 5.3. Окисленные белки.

Окисление белков определяли посредством ОФ-ВЭЖХ.

##### 5.4. рН.

рН измеряли согласно Фарм. Eur.

##### 6. Результаты.

Результаты исследований стабильности, оценка буферного агента в исследовании буферной емкости, а также результаты по стабильности согласно плану эксперимента (ПЭ) для исследования представлены ниже.

Таблица 2. Состав жидких композиций МГЧ (600 МЕ/мл).

Партия №	Буфер	Поверхностно-активное вещество	Консервант	Стабилизатор /Регулятор тоничности
E-01	10 Фосфат <sup>1</sup> 6,8	ММ 0,005 мг/мл полисорбат 20	3,0 мг/мл М-крезол	41,3 мг/мл Маннитол
E-02	10 Фосфат <sup>1</sup> 6,8	ММ 0,005 мг/мл полисорбат 20	3,0 мг/мл М-крезол	85,9 мг/мл Трегалоза
E-03	10 Фосфат <sup>1</sup> 6,8	ММ 0,1 мг/мл Полоксамер 188	3,0 мг/мл М-крезол	74,3 мг/мл Сахароза
E-04	10 Фосфат <sup>1</sup> 6,8	ММ 0,1 мг/мл Полоксамер 188	3,0 мг/мл М-крезол	18,8 мг/мл Глицин
E-05	10 Фосфат <sup>1</sup> 6,8	ММ 0,005 мг/мл полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	67,7 мг/мл Сахароза
E-06	10 Фосфат <sup>1</sup> 6,8	ММ 0,005 мг/мл полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	6,8 мг/мл NaCl
E-07	10 Фосфат <sup>1</sup> 6,8	ММ 0,1 мг/мл Полоксамер 188	5,0 мг/мл Фенол	37,6 мг/мл Маннитол
E-08	10 Цитрат <sup>2</sup> рН 6,8	ММ 0,005 мг/мл полисорбат 20	3,0 мг/мл М-крезол	71,1 мг/мл Сахароза
E-09	10 Цитрат <sup>2</sup> рН 6,8	ММ 0,005 мг/мл полисорбат 20	3,0 мг/мл М-крезол	29,3 мг/мл L- аргинин HCl
E-10	10 Цитрат <sup>2</sup> рН 6,8	ММ 0,1 мг/мл Полоксамер 188	3,0 мг/мл М-крезол	39,5 мг/мл Маннитол
E-11	10 Цитрат <sup>2</sup> рН 6,8	ММ 0,005 мг/мл полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	74,7 мг/мл Трегалоза
E-12	10 Цитрат <sup>2</sup> рН 6,8	ММ 0,1 мг/мл Полоксамер 188	5,0 мг/мл Фенол	64,5 мг/мл Сахароза
E-13	10 Цитрат <sup>2</sup> рН 6,8	ММ 0,1 мг/мл Полоксамер 188	5,0 мг/мл Фенол	6,5 мг/мл NaCl
E-14	10 Гистидин 6,8	ММ 0,005 мг/мл полисорбат 20	3,0 мг/мл М-крезол	77,5 мг/мл Сахароза
E-15	10 Гистидин рН 6,8	ММ 0,1 мг/мл Полоксамер 188	3,0 мг/мл М-крезол	19,6 мг/мл Глицин

<sup>1</sup> 10 мМ Динатрийгидрофосфат додекагидрат, рН регулируют фосфорной кислотой.<sup>2</sup> 10 мМ Тринатрийцитрат дигидрат, рН регулируют лимонной кислотой.

## 6.1. Стабильность жидкой композиции МГЧ/3 месяца.

Молекулы белка можно стабилизировать добавлением к раствору эксципиентов, например солей, углеводов или аминокислот, но степень стабилизации при добавлении различных углеводов, солей и аминокислот значительно варьирует в ряду различных композиций. В описании настоящего изобретения, первоначальные исследования стабильности проводили, чтобы провести скрининг различных стабилизаторов в комбинации с консервантами и буферами в жидкой композиции МГЧ. Неожиданно, результаты показывают превосходный стабилизирующий эффект L-аргинина, как показано в табл. 3 и 6 для результатов иммунологического анализа ХГЧ и табл. 4 и 7 для результатов иммунологического анализа ФСГ. Композиция E-09 проявляет превосходящую стабильность по сравнению со всеми другими композициями. Композиция E-09 является единственной композицией, которая содержит L-аргинин (см. табл. 2). Композиции K-01, K-03 и K-04, а также K-09 проявляют превосходящую стабильность по сравнению со всеми другими композициями (см. табл. 6). Эти композиции также содержат L-аргинин (см. табл. 5). В табл. 4 композиция E-09 выделяется наилучшей стабильностью по сравнению со всеми другими композициями также по результатам иммунологического анализа ФСГ, а табл. 7 подтверждает, что композиция K-09 показывает наивысший результат иммунологического анализа ФСГ по сравнению со всеми другими композициями.

Таблица 3. Иммунологический анализ ХГЧ во время 1 месяца хранения при  $30\pm 2^\circ\text{C}/65\pm 5\%$  ОВ. Композиция E-09 проявляет превосходящую стабильность по сравнению со всеми другими композициями. Композиция E-09 содержит L-аргинин, см. табл. 2.

ХГЧ [% от начального]		$30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\%$ ОВ	
Композиция	Начальный	0,5 месяца	1 месяц
E-01	100	91	85
E-02	100	88	87
E-03	100	87	80
E-04	-	-	-
E-05	100	83	81
E-06	100	101	100
E-07	100	89	87
E-08	100	89	81
E-09 (L-аргинин HCl)	100	113	106
E-10	100	95	91
E-11	100	99	89
E-12	100	94	87
E-13	100	99	86
E-14	-	-	-
E-15	-	-	-

(Композиции E-04, E-14 и E-15 исключены из тестирования вследствие окрашивания).

Таблица 4 Иммунологический анализ ФСГ через 3 месяца хранения при  $30\pm 2^\circ\text{C}/65\pm 5\%$  ОВ. Композиция E-09 проявляет наилучшую стабильность по сравнению со всеми другими композициями. Композиция E-09 содержит L-аргинин, см. табл. 2.

ФСГ [% от начального]	30°C ± 2°C/65 ± 5% ОВ	
Композиция	Начальный	3 месяца
Е-01	100	83
Е-02	100	77
Е-03	100	83
Е-04	-	-
Е-05	100	84
Е-06	100	86
Е-07	100	86
Е-08	100	84
Е-09		95
(L-аргинин)	100	
Е-10	100	83
Е-11	100	83
Е-12	100	89
Е-13	100	85
Е-14	-	-
Е-15	-	-

(Композиции Е-04, Е-14 и Е-15 исключены из тестирования вследствие окрашивания).

#### 6.2 Стабильность жидкой композиции МГЧ - 3 месяца.

Исходя из результатов первоначального скрининга, скринингу подвергали дополнительные композиции с аргинином.

Таблица 5. Исследование стабильности состава для жидкой композиции МГЧ 600 МЕ/мл - Обзор композиций.

Партия №	Буфер	Поверхностно-активное вещество	Консервант	Антиоксидант	Стабилизатор/Регулятор тоничности
К-01 <sup>1</sup>	10	ММ 0,005 мг/мл	3,0	1,5	
	Цитрат <sup>5</sup> 6,8	рН Полисорбат 20	МГ/мл М- крезол	МГ/мл М- метионин	Л- 28,0 мг/мл Л- аргинин HCl
К-02	1	ММ 0,005 мг/мл	3,0	1,0	21,0 мг/мл
	Фосфат <sup>4</sup> 6,8	рН Полисорбат 20	МГ/мл М- крезол	МГ/мл М- метионин	Л- Лактоза 7,0 мг/мл NaCl
К-03	10	ММ 0,1 мг/мл	5,0	1,5	25,3 мг/мл
	Цитрат <sup>5</sup> 6,8	рН Полоксамер 188	МГ/мл Фенол	МГ/мл метионин	Л- аргинин HCl
К-04	10	ММ 0,005 мг/мл	3,0	1,5	29,3 мг/мл
	Фосфат <sup>4</sup> 6,8	рН Полисорбат 20	МГ/мл М- крезол	МГ/мл М- метионин	Л- аргинин HCl
К-05 <sup>2</sup>	10	ММ 0,1 мг/мл	5,0	1,0	67,4 мг/мл
	Цитрат <sup>5</sup> 6,8	рН Полоксамер 188	МГ/мл Фенол	МГ/мл метионин	Л- Сахароза
К-06	10	ММ 0,1 мг/мл	3,0	1,0	74,6 мг/мл
	Цитрат <sup>5</sup> 6,8	рН Полоксамер 188	МГ/мл М- крезол	МГ/мл М- метионин	Л- Сахароза
К-07 <sup>3</sup>	10	ММ 0,1 мг/мл	3,0	1,0	38,3 мг/мл
	Цитрат <sup>5</sup> 6,8	рН Полоксамер 188	МГ/мл М- крезол	МГ/мл М- метионин	Л- Маннитол
К-08	10	ММ 0,1 мг/мл	5,0	1,0	34,7 мг/мл
	Цитрат <sup>5</sup> 6,8	рН Полоксамер 188	МГ/мл Фенол	МГ/мл метионин	Л- Маннитол
К-09 <sup>6</sup>	10	ММ 0,1 мг/мл	3,0	1,5	20 мг/мл
	Цитрат <sup>5</sup> 6,8	рН Полоксамер 188	МГ/мл М- крезол	МГ/мл М- метионин	Л- аргинин HCl 22,1 мг/мл Сахароза
1	Такой же, как для композиции Е-09 в Таблице 2				
2	Такой же, как для композиции Е-12 в Таблице 2				
3	Такой же, как для композиции Е-10 в Таблице 2				
4	10	ММ Динатрийгидрофосфат додекагидрат,	рН	регулируют лимонной кислотой	
5	10	ММ Тринатрийцитрат дигидрат,	рН	регулируют лимонной кислотой	
6	Мощность 530 МЕ/мл				

Таблица 6. Иммунологический анализ ХГЧ во время 3 месяцев хранения при  $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$  ОВ. Композиции К-01, К-03, К-04 и К-09 проявляют превосходящую стабильность по сравнению со всеми другими композициями. Композиции К-01, К-03, К-04 и К-09 содержат L-аргинин, см. табл. 5.

ХГЧ [% от начального]		$25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/65 \pm 5\%$ ОВ		
Композиция	Начальный	1 месяц	2 месяца	3 месяца
К-01 (L-аргинин)	100	110	105	105
К-02	100	100	68	57
К-03 (L-аргинин)	100	110	106	104
К-04 (L-аргинин)	100	109	106	113
К-05	100	94	82	71
К-06	100	98	76	80
К-07	100	85	74	67
К-08	100	93	79	71
К-09 (L-аргинин)	100	99	101	100

Вполне понятно, что композиции, содержащие L-аргинин, являются гораздо более стабильными, чем композиции, содержащие различные стабилизирующие агенты. Сравнение, например композиций К-02 и К-03 через три месяца.

Таблица 7. Иммунологический анализ ФСГ во время 3 месяцев хранения при  $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$  ОВ. Композиция К-09 показывает наивысший результат иммунологического анализа ФСГ по сравнению со всеми другими композициями. Композиция К-09 содержит L-аргинин, см. табл. 5.

ФСГ [% от начального]		$25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ ОВ		
Композиция	Начальный	1 месяц	2 месяца	3 месяца
К-01 (L-аргинин)	100	112	112	111
К-02	100	104	106	87
К-03 (L-аргинин)	100	108	120	107
К-04 (L-аргинин)	100	108	112	112
К-05	100	107	116	111
К-06	100	109	117	115
К-07	100	101	112	104
К-08	100	107	107	109
К-09 (L-аргинин)	100	112	120	119

Результаты для ХГЧ также подтверждаются для ФСГ сравнение, например, композиций К-02 и К-03 через три месяца.

### 6.3. Исследование буферной емкости.

Буферные агенты, например фосфат натрия и цитрат натрия, являются физиологически переносимыми буферами и довольно часто добавляются для поддержания рН в желательном интервале. Тринатрийцитрата дигидрат и динатрийгидрофосфата додекагидрат оценивают как буферные агенты посредством буферной емкости. Буферную емкость рассчитывают как количество кислоты или основания, необходимое для сдвига рН до предварительно заданного значения, т.е. количество мкл 0,2н.

HCl/NaOH, необходимое для сдвига pH на 1 единицу pH/л ЛП, рассчитанное как мЭкв кислоты или основания/(литр×единицы pH), как объясняется выше.

Исследование буферной емкости состава - Обзор композиций

Партия №	Буфер	Поверхностно-активное вещество	Консервант	Антиоксидант	Стабилизатор/Регулятор тоничности
C-01	Нет буфера pH 6,8	0,005 мг/мл Полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	1,5 мг/мл метионин	L- 120 мМ L- аргинин HCl <sup>4</sup>
C-02	5 мМ Цитрат <sup>1</sup> pH 6,8	0,005 мг/мл Полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	1,5 мг/мл метионин	L- 120 мМ L- аргинин HCl <sup>4</sup>
C-03	10 мМ Цитрат <sup>1</sup> pH 6,8	0,005 мг/мл Полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	1,5 мг/мл метионин	L- 120 мМ L- аргинин HCl <sup>4</sup>
C-04 <sup>3</sup>	1 мМ <sup>2</sup> Фосфат pH 6,5	0,005 мг/мл Полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	1,0 мг/мл метионин	L- Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> × 10 H <sub>2</sub> O (14 мг/мл Сульфат натрия)

<sup>1</sup> Тринатрийцитрата дигидрат.

<sup>2</sup> 0,8 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O и приблизительно 0,2 мМ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> до pH 6,5.

<sup>3</sup> Эталонное плацебо.

<sup>4</sup> Равно 25,3 мг/мл L-аргинина HCl.

Результат титрования, проведенного для определения буферной емкости, отображен на фиг. 1. Угол наклона кривых показывает буферную емкость, например, крутой угол наклона представляет низкую буферную емкость. На фиг. 1 можно наблюдать, что партия C-04 (эталонная композиция) имеет самую низкую буферную емкость. В соответствующей области pH 6,8±0,3 для МГЧ, все композиции МГЧ, C-01 (без буфера), C-02 (5 мМ тринатрийцитрата дигидрата) и C-03 (10 мМ тринатрийцитрата дигидрата) имеют аналогичную буферную емкость и более высокую буферную емкость, чем эталонная композиция, содержащая 1 мМ динатрийгидрофосфата додекагидрата. Целевой pH для эталонной композиции равен 6,5. Композиции C-01, C-02 и C-03 сравнивают с эталоном, который, как известно, имеет стабильный pH. Многочисленные исследования стабильности эталонной композиции C-04 проводили без каких-либо наблюдаемых смещений pH.

Следующая табл. 9 показывает результаты исследования буферной емкости.

Таблица 9. Исследование буферной емкости. В композиции соответствующая область pH 6,8 для МГЧ, все композиции МГЧ имеют более высокую буферную емкость, чем у композиции эталонного плацебо.

Партия	Буфер	Буферная емкость около целевого рН	Интервал рН	$\alpha$ (угол наклона)	Буферная емкость, выраженная как: мЭкв кислоты или основания/ (литр × единиц рН)
С-01	Без буфера	6,8	6,564–6,947	0,001507	1,32
С-01	Без буфера	7,0	6,786–7,193	0,000822	2,44
С-02	5 мМ Тринатрийцитрат дигидрат	6,8	6,599–6,951	0,000672	2,96
С-03	10 мМ Тринатрийцитрат дигидрат	6,8	6,572–6,946	0,000750	2,66
С-04 (эталон)	1 мМ Динатрийгидрофосфат	6,5	6,199–6,752	0,002700	0,74
	додекагидрат				
С-04 (эталон)	1 мМ Динатрийгидрофосфат додекагидрат	6,8	6,582–6,982	0,002091	0,96

(С-01 и С-04 указаны дважды, поскольку буферную емкость рассчитывали в интервалах рН около двух различных значений рН соответственно).

Неожиданно, буферная емкость композиции МГЧ без буфера (С-01) является более высокой, чем у эталонной композиции С-04. Основным эксципиентным компонентом в композиции МГЧ является L-аргинин в концентрации 120 мМ. Значения рКа для L-аргинина составляют рКа1=2,17; рКа2=9,04 и рКа3=12,5 (Handbook of Pharmaceutical Excipients. 2015, Pharmaceutical Press, London). Очень неожиданным является то, что аргинин проявляет достаточное забуферивающее поведение далеко от значений рКа.

#### 6.4. Исследования окисления.

Через 3 месяца хранения при 30±2°C/65±5% ОВ, композиция Е-09, содержащая L-аргинин (см. табл. 5), имеет увеличенный уровень окисленных белков, составляющий 241% от начального значения (см. табл. 10 ниже). Это количество является очень высоким, и существуют случаи, где такие высокие количества окисления нежелательны.

Следовательно, были проведены дополнительные исследования, чтобы выяснить, можно ли преодолеть данную проблему.

Существует несколько вариантов антиоксидантов, которые можно применять в белковых композициях. Метионин можно добавлять для предотвращения окисления посредством предполагаемого механизма конкуренции с окислением остатков метионина в белках. Результат добавления метионина к композиции, содержащей аргинин, показан в табл.10. Композиции К-01, К-03, К-04 и К-09 содержат аргинин и метионин, и уровень окисленных белков очевидно и преимущественно снижается. Композиция К-01 (с метионином) является такой же композицией, как композиция Е-09 (без метионина). Сравнивая эти две партии, можно видеть, что уровень окисленных белков очень сильно снижается под действием метионина.

Таблица 10. % увеличение окисленных белков от начального значения во время 3 месяцев хранения при 30±2°C/65±5% ОВ. Композиция Е-09 содержит аргинин и не содержит метионин. Композиции К-01, К-03, К-04 и К-09 содержат аргинин и метионин, см. табл. 5.

Окисленные белки [увеличение от начального]	30°C ± 2°C/65 ± 5% ОВ
Композиция	3 месяца
Е-01	44
Е-02	39
Е-03	47
Е-04	-
Е-05	37
Е-06	43
Е-07	36
Е-08	51
Е-09 (аргинин и отсутствие метионина)	241
Е-10	55
Е-11	47
Е-12	53
Е-13	46
Е-14	-
Е-15	-
К-01 (аргинин и метионин)	24
К-03 (аргинин и метионин)	12
К-04 (аргинин и метионин)	8
К-09 (аргинин и метионин)	13

(Композиции Е-04, Е-14 и Е-15 были исключены вследствие окрашивания).

В итоге, эти два исследования демонстрируют очень сильный стабилизирующий эффект аргинина и антиокислительный эффект даже низких количеств метионина в композиции гонадотропинов.

#### 6.5. План эксперимента по исследованию стабильности.

При объединении результатов описанных выше исследований и исследования буферной емкости был выполнен ПЭ для исследования, чтобы изучить взаимодействия между аргинином и метионином и определить оптимальные концентрации этих двух эксципиентов.

Таблица 11. Составы для ПЭ по исследованию стабильности для жидкой композиции МГЧ с 600 МЕ/мл - Обзор композиций.

Партия №	Буфер <sup>2</sup>	Поверхностно-активное вещество	Консервант	Антиоксидант	Стабилизатор/регулятор изотоничности
D-01	Без буфера рН 6,8	0,005 мг/мл Полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	1,5 мг/мл L-метионин	80 мМ L-аргинин HCl
D-02	Без буфера рН 6,8	0,005 мг/мл Полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	1,5 мг/мл L-метионин	160 мМ L-аргинин HCl
D-03	Без буфера рН 6,8	0,005 мг/мл Полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	0,8 мг/мл L-метионин	120 мМ L-аргинин HCl
D-04	Без буфера рН 6,8	0,005 мг/мл Полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	0,8 мг/мл L-метионин	120 мМ L-аргинин HCl-
D-05	Без буфера рН 6,8	0,005 мг/мл Полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	0,1 мг/мл L-метионин	160 мМ L-аргинин HCl
D-06	Без буфера рН 6,8	0,005 мг/мл Полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	0,1 мг/мл L-метионин	80 мМ L-аргинин HCl
D-07 <sup>3</sup>	Без буфера рН 6,8	0,1 мг/мл Полоксамер 188	5,0 мг/мл Фенол	1,5 мг/мл L-метионин	120 мМ L-аргинин HCl
D-08 <sup>3</sup>	10 мМ Цитрат <sup>1</sup> рН 6,8	0,1 мг/мл Полоксамер 188	5,0 мг/мл Фенол	1,5 мг/мл L-Метионин	120 мМ L-аргинин HCl

<sup>1</sup> Тринатрийцитрат дигидрат.

<sup>2</sup> рН регулируют с использованием 0,2н. HCl/NaOH для композиций без буфера и 0,2н. NaOH/0,5 М лимонной кислоты моногидрата для композиции с тринатрийцитрат дигидратным буфером.

<sup>3</sup> Включены как эталонные композиции.

#### 6.5.1 Иммунологический анализ ФСГ.

Результаты иммунологического анализа ФСГ по стабильности во время хранения в течение 3 месяцев при 25±2°C/60±5% ОВ приведены в табл. 12.

Таблица 12. Результаты иммунологического анализа ФСГ во время хранения при 25±2°C/60±5% ОВ. Полное описание всех композиций приведено в табл. 11.

ФСГ [МЕ/мл]		25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ		
Композиция	Начальный	1 месяц	2 месяца	3 месяца
D-01	516	501	468	462
D-02	521	492	503	478
D-03	511	503	513	474
D-04	515	505	490	477
D-05	532	521	513	473
D-06	518	488	458	493
D-07	518	528	482	490
D-08	514	499	472	481

Статистический расчет выполняли для активности ФСГ [МЕ/мл], чтобы оценить влияние и взаимодействие аргинина и метионина. Результат статистической оценки подтверждает, что L-аргинин обладает статистически значимым влиянием на результаты по стабильности, полученные методом иммунологического анализа ФСГ. Метионин не имеет статистически значимого влияния на результаты по стабильности, полученные методом иммунологического анализа ФСГ. Для этого параметра отклика не существует статистически значимого взаимодействия между аргинином и метионином.

#### 6.5.2 Иммунологический анализ ХГЧ.

Результаты иммунологического анализа ХГЧ по стабильности во время хранения в течение 3 месяцев при 25±2°C/60±5% ОВ приведены в табл. 13.

Таблица 13. Результаты иммунологического анализа ХГЧ во время хранения при  $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$  ОВ. Полное описание всех композиций приведено в табл. 11.

ХГЧ [МЕ/мл]		$25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ ОВ			
Композиция	Начальный		1 месяц	2 месяца	3 месяца
D-01	83		82	75	56
D-02	87		83	93	76
D-03	93		93	88	70
D-04	86		91	87	70
D-05	90		98	92	85
D-06	87		85	72	61
D-07	93		92	88	71
D-08	91		96	94	81

Статистический расчет выполняли для активности ХГЧ [МЕ/мл], чтобы оценить влияние и взаимодействие аргинина и метионина. Результат статистической оценки подтверждает, что аргинин имеет статистически значимое влияние на результаты по стабильности, полученные методом иммунологического анализа ХГЧ. Содержание метионина имеет минорное влияние при  $25^\circ\text{C}$  на результаты по стабильности, полученные методом иммунологического анализа ХГЧ. Становится понятным, что свыше низкой (0,1 мг/мл) концентрации метионина никакое дальнейшее увеличение стабильности при повышении концентрации даже до 1,5 мг/мл не является обнаруживаемым. Для этого параметра отклика не существует статистически значимого взаимодействия между аргинином и метионином.

#### 6.5.3. Окисленные белки.

В описанных выше исследованиях стабильности неожиданно наблюдали, что присутствие аргинина имеет очень сильный стабилизирующий эффект. Однако добавление аргинина приводило к увеличенному уровню окисленных белков. Для предотвращения этого окисления можно добавлять метионин, и в этом исследовании изучали концентрационный баланс между аргинином как стабилизатором и метионином как антиоксидантом.

Результаты исследования стабильности по количеству окисленных белков [% увеличение от начального] во время хранения в течение 6 месяцев при  $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$  ОВ и 3 месяцев при  $30\pm 2^\circ\text{C}/65\pm 5\%$  ОВ для композиций с аргинином и метионином (в интервале концентраций 0,1-1,5 мг/мл) приведены ниже. Для сравнения композиция E-09 с аргинином и без метионина также включена в табл. 14.

Таблица 14. Результаты по окисленным белкам во время хранения при  $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$  ОВ и  $30\pm 2^\circ\text{C}/65\pm 5\%$  ОВ. Полное описание всех композиций приведено в табл. 11.

Окисленные белки [% увеличение от начального]	30°C ± 2°C/65 ± 5% ОВ			25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ			
Композиция	1 мес	2 месяца	3 месяца	1 месяц	2 месяца	3 месяца	6 месяцев
D-01	5,5	4,1	8,3	10,1	4,1	9,6	6,9
D-02	9,9	8,5	10,3	11,7	11,7	6,6	8,5
D-03	10,9	10,0	11,4	12,3	13,3	11,8	12,8
D-04	8,9	8,4	8,9	8,9	11,2	9,8	8,9
D-05	12,9	13,8	13,8	13,3	20,5	11,0	15,2
D-06	7,0	9,8	11,6	10,7	7,9	9,3	11,2
D-07	14,0	10,1	11,1	14,5	13,5	15,0	10,1
D-08	7,6	9,5	7,6	13,3	9,0	11,8	7,6
E-09 (без L-метионина)	-	-	241	-	-	-	-

Из табл. 14 можно неожиданно видеть, что даже небольшие количества метионина являются достаточно точными для предотвращения окисления в целом интервале концентраций аргинина.

#### 6.5.4. Краткое изложение ПЭ.

Чтобы завершить и обобщить результаты ПЭ, применяли оптимизатор отклика в Minitab, см. фиг. 2. Программа Minitab Response Optimizer показывает, каким образом различные установки экспериментального фактора, например концентрации аргинина и метионина, воздействуют на предсказанные отклики, например результаты иммунологического анализа ФСГ [МЕ/мл] и результаты иммунологического анализа ХГЧ [МЕ/мл] для составления факторного плана. График оптимизации показывает эффект от каждого фактора (столбцы) на отклики (строки). Вертикальные жирные линии на графике представляют текущие установки фактора. Числа, отображаемые наверху столбца, показывают текущий уровень установок фактора (в квадратных скобках). Горизонтальные пунктирные линии и соответствующие числа представляют отклики для текущего уровня фактора. Оптимизатор отклика будет основан на результатах при 25°C. Результат применения оптимизатора отклика отображен на фиг. 2. Наилучшую стабильность (композиционную желательность) получают при высоких концентрациях аргинина и низких концентрациях метионина.

#### 6.6. Исследование рН.

В исследовании буферной емкости было показано, что буферный агент не является необходимым в композиции МГЧ при использовании только аргинина для стабилизации рН в желательном интервале рН.

Для подтверждения того, что рН поддерживается во время хранения, его измеряли в течение 6 месяцев хранения при 25±2°C/60±5% ОВ и 3 месяцев при 30±2°C/65±5% ОВ. Результаты приведены в табл. 15.

Целевой рН для всех композиций составлял рН 6,8 и рН всех композиций составлял 6,8 при начальной временной отметке. рН был довольно стабильным, но немного увеличивался до около 6,9 через 2 месяца и поддерживался около рН 6,9 до 6 месяцев хранения. Результаты до 6 месяцев хранения подтверждают стабильность рН в тестируемом интервале концентраций аргинина.

Таблица 15. Результаты исследования рН.

рН		30°C ± 2°C/65 ± 5%		25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ		
		ОВ		2	3	6
Композиция	Начальный	2 месяца	3 месяца	2 месяца	3 месяца	6 месяцев
D-01	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
D-02	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-03	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-04	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-05	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-06	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-07	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8
D-08	6,8	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9

#### 7. Заключение.

Очень неожиданно буферная емкость композиции МГЧ без буфера является более высокой, чем у эталонной композиции с 1 мМ динатрийгидрофосфата додекагидрата. Основным эксципиентным компонентом в композиции МГЧ является аргинин. Значения рКа для аргинина составляют рКа1=2,17; рКа2=9,04 и рКа3=12,5. Неожиданно, что аргинин проявляет достаточное забуферивающее поведение в области далекой от его значений рКа. Однако результаты ясно показывают, что в композиции МГЧ не требуется никакой дополнительной буферный агент в рассматриваемом интервале рН. Только один аргинин является достаточным для поддержания рН в желательном интервале рН. Стабильность рН была подтверждена при тестировании ПЭ для исследования интервала концентраций аргинина в течение 6 месяцев хранения при 25±2°C/60±5% ОВ и 3 месяцев хранения при 30±2°C/65±5% ОВ, что подтверждает наблюдения, сделанные при исследовании буферной емкости.

Было показано, что добавление аргинина к жидкой композиции МГЧ настоящего изобретения оказывает очень мощный стабилизирующий эффект на жидкие композиции МГЧ. Однако также было установлено, что аргинин приводит к высокому уровню окисленных белков. Было показано, что добавление метионина предотвращает окисление в сравнении с композицией без метионина.

Во время 6 месяцев хранения при 25±2°C/60±5% ОВ и 3 месяцев хранения при 30±2°C/65±5% ОВ было показано, что даже малая концентрация метионина предотвращает окисление.

Подводя итог результатам этих исследований, хорошо видно, что добавления аргинина достаточно для поддержания рН на желательном уровне рН. Добавление аргинина значительно стабилизирует тестируемую композицию гонадотропина в виде жидкой композиции. Никакие другие из тестируемых аминокислот, сахаров или солей не показали аналогичный стабилизирующий эффект. Уровень окисленных белков значительно увеличивался при добавлении аргинин, однако добавление даже низких количеств метионина предотвращает окисление белков. Неожиданным является, что даже малых количеств метионина достаточно, чтобы предотвратить окисление независимо от концентрации аргинина.

#### Пример 2.

Авторы настоящего изобретения дополнительно подтвердили, что представленная преимущественная композиция настоящего изобретения могла бы также быть применимой для стабилизации соответствующей композиции рекомбинантного гонадотропина.

С этой целью рекомбинантный ФСГ и рекомбинантный ХГЧ (с последовательностями, описанными выше, соответственно) получали согласно хорошо известным способам.

Ускоренное исследование стабильности проводили для двух композиций, содержащих рХГЧ или рФСГ соответственно, как описано ниже.

Наблюдаемый неожиданный стабилизирующий эффект аргинина был также подтвержден для рекомбинантных белков. Как рФСГ, так и рХГЧ составляли в 5 мг/мл фенола, 0,15 мг/мл L-метионина, 150 мМ аргинина HCl, 0,005 мг/мл полисорбата 20, рН 6,8. Чтобы упростить анализ стабильности белка, рФСГ и рХГЧ составляли в различных контейнерах.

Таблица 16.

	Иммунная активность (МЕ/мл)				
	Начальная	1 месяц, 30°C	2 месяца, 30°C	4 месяца, 30°C	16 месяцев, 5°C
ФСГ [33,3 мкг/мл]	464	444	456	469	435
рХГЧ [50 мкг/мл]	711	680	656	600	685

	SEC (Чистота рФСГ, %)				
	Начальная	1 месяц, 30°C	2 месяца, 30°C	4 месяца, 30°C	16 месяцев, 5°C
ФСГ [33,3 мкг/мл]	98,9	98,6	98,3	97,9	96,9

	HIC (Чистота рХГЧ, %)				
	Начальная	1 месяц, 30°C	2 месяцев, 30°C	4 месяца, 30°C	14 месяцев, 5°C
рХГЧ [50 мкг/мл]	98,8	96,8	93,3	89,4	99,9

Эти данные полностью подтверждают, что композиция с аргинином, но без дополнительного буфера согласно настоящему изобретению и с низким количеством метионин является также применимой для стабилизированных рекомбинантных гонадотропинов.

Пример 3.

Проводили дополнительные исследования, где оценивали следующий состав.

Таблица 17. Состав жидкой композиции 625 МЕ/мл МГЧ.

Партия №	Буфер <sup>1</sup>	Поверхностно-активное вещество	Консервант	Антиоксидант	Стабилизатор
J-01	Без буфера pH 6,8	0,005 мг/мл Полисорбат 20	5,0 мг/мл Фенол	0,15 мг/мл L-Метионин	150 мМ L-аргинин HCl

<sup>1</sup> pH регулируют 0,2 N HCl/NaOH

Стабильность целевой композиции.

Объединяя все предыдущие результаты, хорошую стабильность приведенной выше композиции подтверждали следующим образом.

Таблица 18. Иммунологический анализ ФСГ.

Результаты исследования стабильности методом иммунологического анализа ФСГ во время хранения в течение 3 месяцев при 25±2°C/60±5% относительной влажности (ОВ) и 12 месяцев при 5±3°C:

Результаты иммунологического анализа ФСГ во время хранения при 25±2°C/60±5% ОВ и 12 месяцев при 5±3°C.

ФСГ [% от начального]		25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ			5°C ± 3°C	
Композиция	Начальная	1 месяц	2 месяца	3 месяца	3 месяца	12 месяцев
У-01	100	95,2	95,9	98,8	96,8	100,5

Результаты подтверждают стабильность, как определено посредством иммунологического анализа ФСГ.

Таблица 19. Иммунологический анализ ХГЧ.

Результаты исследования стабильности методом иммунологического анализа ХГЧ во время хранения в течение 1 месяца при 25±2°C/60±5% ОВ и в течение 12 месяцев при 5±3°C приведены в табл. 19.

Результаты иммунологического анализа во время хранения ХГЧ при 25±2°C/60±5% ОВ и 12 месяцев при 5±3°C.

ХГЧ [% от начального]		25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ			5°C ± 3°C	
Композиция	Начальная	1 месяц			3 месяца	12 месяцев
У-01	100	88,3			94,1	89,5

Результаты подтверждают стабильность, как определено методом иммунологического анализа ХГЧ.

Таблица 20. Окисленные белки.

Результаты исследования стабильности по количеству окисленных белков [% увеличение от начального] во время хранения в течение 3 месяцев при 25±2°C/60±5% ОВ и 12 месяцев при 5±3°C.

Результаты по окисленным белкам во время хранения при 25±2°C/60±5% ОВ и 12 месяцев при 5±3°C.

Окисленные белки [% увеличение от начального]		25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ			5°C ± 3°C	
Композиция	Начальная	1 месяц	2 месяца	3 месяца	3 месяца	12 месяцев
У-01		1,8	5,7	7,9	2,6	11

рН.

Результаты стабильности рН во время хранения в течение 3 месяцев при 25±2°C/60±5% ОВ и 12 месяцев при 5±3°C показывают стабильные значения рН.

Таблица 21. Результаты измерения рН во время хранения при 25±2°C/60±5% ОВ и 12 месяцев при 5±3°C.

рН		25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ			5°C ± 3°C	
Композиция	Начальный	1 месяц	2 месяца	3 месяца	3 месяца	12 месяцев
У-01	6,9	6,7	6,8	6,7	6,7	6,8

Пример 4.

В дополнение к описанному выше, авторы настоящего изобретения также провели исследование стабильности с использованием метода биологического анализа (6 месяцев хранения при 25°C для партий согласно ПЭ).

Метод биологического анализа ФСГ (Стилман-Поли).

Результаты исследования стабильности с использованием метода биологического анализа ФСГ во время хранения в течение 6 месяцев при 25±2°C/60±5% ОВ приведены в табл. 22.

Таблица 22. Результаты применения метода биологического анализа ФСГ во время хранения при 25±2°C/60±5% ОВ. Полное описание всех композиций приведено в табл. 11.

ФСГ [% от установленной активности (600 МЕ/мл) ]	25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ
Композиция	6 месяцев
D-01	98,8
ФСГ [% от установленной активности (600 МЕ/мл) ]	25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ
D-02	100,7
D-03	102,0
D-04	104,7
D-05	103,4
D-06	101,0
D-07	102,6
D-08	104,9

Результаты подтверждают стабильность, как определено методом биологического анализа ФСГ.

Метод биологического анализа ЛГ (прирост массы семенной жидкости).

Результаты исследования стабильности методом биологического анализа ЛГ во время хранения в течение 6 месяцев при 25±2°C/60±5% ОВ приведены в табл. 23.

Таблица 23. Результаты применения метода биологического анализа ЛГ во время хранения при 25±2°C/60±5% ОВ. Полное описание всех композиций приведено в табл. 11.

ЛГ [% от установленной активности (600 МЕ/мл) ]	25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ
Композиция	6 месяцев
D-01	87,8
D-02	101,3
D-03	90,9
D-04	95,6
D-05	97,5
D-06	95,0
D-07	97,3
D-08	100,1

Результаты подтверждают стабильность, как определено методом биологического анализа ЛГ.

Кроме того, состав примера 3 также тестировали методом биологического анализа ФСГ и ЛГ с получением следующих результатов:

Результаты исследования стабильности методом биологического анализа ФСГ во время хранения в течение 3 месяцев при 25±2°C/60±5% ОВ и 12 месяцев при 5±3°C приведены в табл. 24.

Таблица 24. Результаты применения метода биологического анализа ФСГ во время хранения при 25±2°C/60±5% ОВ и 12 месяцев при 5±3°C.

ФСГ [% от установленной активности (625 МЕ/мл)]		25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ			5°C ± 3°C	
Композиция	Начальная	1	2	3	3	12
		месяц	месяца	месяца	месяцев	месяцев
У-01	94,7	93,6	94,5	97,6	95,8	96,1

Результаты подтверждают стабильность, определенную методом биологического анализа ФСГ.

Результаты исследования стабильности методом биологического анализа ЛГ во время хранения в течение 3 месяцев при 25±2°C/60±5% ОВ и 12 месяцев при 5±3°C приведены в табл. 25.

Таблица 25. Результаты применения метода биологического анализа ЛГ во время хранения при 25±2°C/60±5% ОВ и 12 месяцев при 5±3°C.

ЛГ [% от установленной активности (625 МЕ/мл)]		25°C ± 2°C/60 ± 5% ОВ			5°C ± 3°C	
Композиция	Начальная	1	2	3	3	12
		месяц	месяца	месяца	месяца	месяцев
У-01	102,1	102,2	99,0	100,0	101,5	100,0

Результаты подтверждают стабильность, определенную методом биологического анализа ЛГ.

#### 8. Сокращения и определения.

ВР - Британская фармакопея;

ПЭ - план эксперимента;

ЛВ - лекарственное вещество;

ФСГ - фолликулостимулирующий гормон;

ХГЧ - хорионгонадотропин человека;

МГЧ - менопаузальный гонадотропин человека;

МГЧ-НР - высокоочищенный менопаузальный гонадотропин человека;

ЯР - фармакопея Японии;

ЛГ - лютеинизирующий гормон;

МД - множественная доза;

НФ - национальный формуляр;

Фарм. Еиг - Европейская фармакопея;

PS 20 - полисорбат 20;

USP - фармакопея США;

ВДИ - вода для инъекций.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкая фармацевтическая композиция гонадотропина, содержащая гонадотропин, аргинин в количестве от 50 до 160 мМ и метионин в количестве от 0,1 до 1 мг/мл, где композиция не содержит дополнительного буфера и где рН композиции находится между 6,0 и 7,5.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где гонадотропин содержит ХГЧ (хорионгонадотропин человека) и необязательно ФСГ и/или ЛГ.

3. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2, где гонадотропин содержит МГЧ (менопаузальный гонадотропин человека).

4. Фармацевтическая композиция по любому одному из пп.1-3, где гонадотропин содержит выделенные из мочи человеческого происхождения ФСГ, ЛГ и/или ХГЧ.

5. Фармацевтическая композиция по любому одному из пп.1-3, где гонадотропин содержит рекомбинантные ФСГ, ЛГ и/или ХГЧ.

6. Фармацевтическая композиция по любому одному из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая консервант, предпочтительно фенол.

7. Фармацевтическая композиция по любому одному из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая поверхностно-активный агент, предпочтительно полисорбат, даже более предпочтительно полисорбат 20.

8. Фармацевтическая композиция по п.6 или 7, где консервант, предпочтительно фенол, содержится в количестве 4-6 мг/мл, предпочтительно в количестве 5 мг/мл.

9. Фармацевтическая композиция по п.7 или 8, где поверхностно-активный агент, предпочтительно полисорбат 20, содержится в количестве 0,001-0,05 мг/мл, предпочтительно в количестве 0,005 мг/мл.

10. Фармацевтическая композиция по любому одному из предшествующих пунктов, где аргинин представляет собой предпочтительно L-аргинин HCl.

11. Фармацевтическая композиция по любому одному из предшествующих пунктов, где МГЧ содержится в количестве 300-900, предпочтительно 500-700 МЕ/мл.

12. Фармацевтическая композиция по любому одному из предшествующих пунктов, которая состоит из

625 МЕ/мл МГЧ,  
0,15 мг/мл метионина,  
150 мМ аргинина,  
5 мг/мл фенола,  
0,005 мг/мл полисорбата 20,  
воды для инъекций (ВДИ),  
где композиция имеет рН  $6,8 \pm 0,3$ .

13. Жидкая фармацевтическая композиция по любому одному из предшествующих пунктов для лечения бесплодия.

14. Фармацевтическая композиция по п.13, где лечение представляет собой индукцию овуляции (OI), вспомогательные репродуктивные технологии (ART) и/или лечение гипогонадотропного гипогонадизма у мужчин.

15. Способ стабилизации жидкой фармацевтической композиции, содержащей МГЧ, который включает стадии:

предоставление образца мочи от женщины;

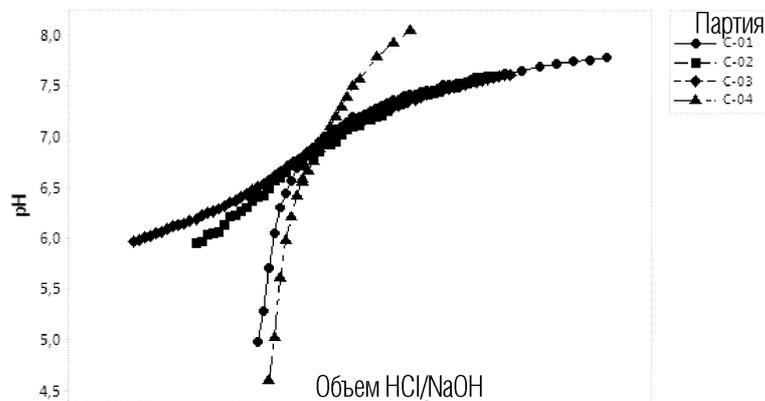
экстракция МГЧ из образца;

составление указанного экстракта с аргинином и метионином в количествах, определенных в любом из предшествующих пунктов;

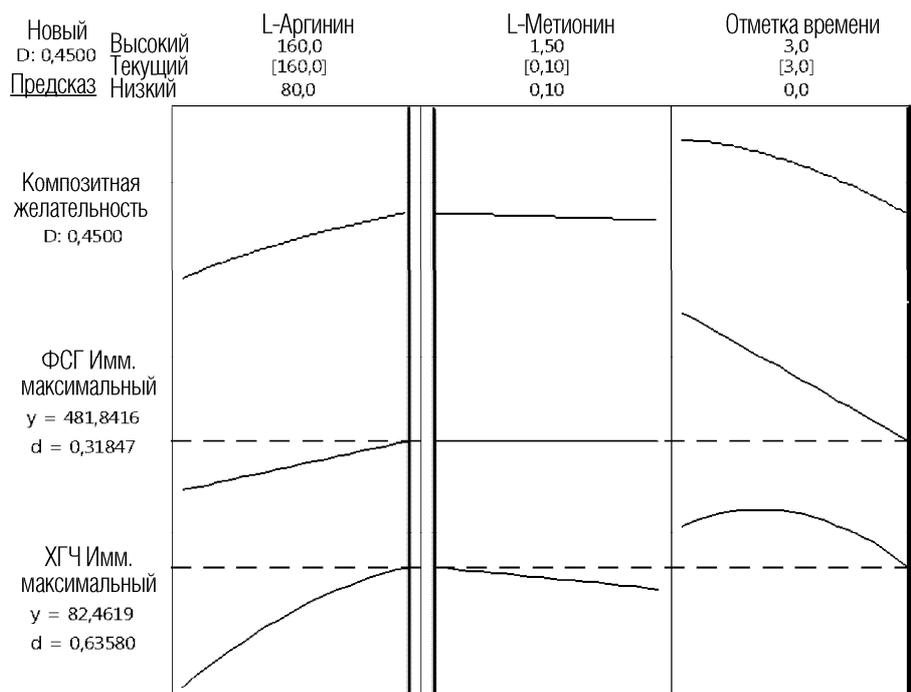
необязательное дополнительное добавление фенола и полисорбата в количествах, определенных в любом из предшествующих пунктов;

регуляция рН композиции до между 6,0 и 7,5,

где не добавляют дополнительного буфера.



Фиг. 1



Фиг. 2

