



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95461 (13) C2

(51) МПК

B01D 15/34 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛОКСАМЕРІВ

1

(21) a200804714
(22) 14.09.2006
(24) 10.08.2011
(86) PCT/EP2006/066383, 14.09.2006
(31) 05108439.0
(32) 14.09.2005
(33) EP
(31) 60/717,642
(32) 16.09.2005
(33) US
(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.
(72) РОССІ МАРА, ІТ
(73) АРЕС ТРЕЙДІНГ С.А., СН
(56) WO A 2004/104025, 02.12.2004.

MAO Y ET AL: "Quantitation of poloxamers in pharmaceutical formulations using size exclusion chromatography and colorimetric methods" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, NEW YORK, NY, US, 2004, vol. 35, no. 5, P. 1127-1142.

JEWELL R.C. ET AL: "Pharmacokinetics of RheothRx injection in healthy male volunteers" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 1997, vol. 86, no. 7, P. 808-812.

MANOHAR KATAKAM ET AL: "Effect of Surfactants on the Physical Stability of Recombinant Human Growth Hormone" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION. WASHINGTON, US, 1995, vol. 84, no. 6, P. 713-716.

OGHIMI S M ET AL: "Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, FloCor(TM))-induced complement activation in human sera - A protective role against poloxamer-mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, AMSTERDAM, NL, 2004, vol. 1689, no. 2, P. 103-113.

2

(57) 1. Спосіб кількісного визначення полоксамеру в рідкому зразку білка, що передбачає стадії, в ході яких згаданий зразок піддають:

(а) стадії поділу за допомогою колонки ексклюзійної гель-хроматографії;

(b) стадії елюції рухомою фазою; і

(с) стадії детектування полоксамеру, де білок має молекулярну масу 5-70 кДа, переважно 20-70 кДа, при цьому рН рухомої фази, яку використовують на стадії елюції, встановлений нижче 3.

2. Спосіб за п. 1, в якому полоксамер являє собою Полоксамер 188.

3. Спосіб за п. 1 або 2, в якому білок являє собою гетеродимерний білок.

4. Спосіб за п. 3, в якому білок являє собою гонадотропін, вибраний з FSH, LH, hCG, TSH.

5. Спосіб за п. 1 або 2, в якому аналізований білок являє собою інтерферон-β або гормон росту (GH).

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, в якому зразок являє собою водну фармацевтичну композицію, що містить FSH, LH, hCG, TSH, GH або інтерферон-β.

7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, в якому рухомою фазою є водний, зокрема буферний, розчинник.

8. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому рН рухомої фази встановлений близько 1,9-2,0.

9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, в якому стадія детектування полоксамеру включає аналіз коефіцієнта заломлення.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, в якому колонка ексклюзійної гель-хроматографії являє собою колонку SE-HPLC, заповнену матрицею на полімерній основі, що містить кульки.

11. Спосіб за п. 10, в якому кульки в матриці мають розмір частинок 10 або 17 мкм.

12. Спосіб за п. 10 або 11, в якому кульки матриці мають розмір пор близько 200 Å.

Галузь техніки, до якої належить винахід

Винахід належить до галузі аналітичного визначення поверхнево-активної речовини, що належить до класу полоксамерів, в рідкому зразку білка.

Попередній рівень техніки

Полоксамери є неіонними блок-співполімерами етиленоксиду (EO) і пропіленоксиду (PO). Вони використовуються в фармацевтичних складах як поверхнево-активні речовини, ему-

(19) UA (11) 95461 (13) C2

льгуючі агенти, солюбілізуючі агенти і диспергуючі агенти.

Добре відомим аналітичним підходом в характеристиці поллоксамеру є калориметричний спосіб, в якому аналізують поглинання ультрафіолетового випромінювання (UV) на довжинах хвиль 320 і 620 нм, що дається при формуванні комплексу поллоксамеру з тіоціанатом кобальту (II).

Yun Mao et al (Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 35 (2004), 1127) описують використання для визначення поллоксамеру ексклюзійної гель-хроматографії (SEC) із застосуванням колонки, що містить THF як рухоми фазу, і визначення коефіцієнта заломлення (RI). Спосіб був застосований до фармацевтичних складів Avargo, Neurontin і Sudafed, в яких активний початок являє собою «малу молекулу». Малі молекули можуть бути легко відділені за допомогою SEC від поллоксамерів з великою молекулярною масою.

Ексклюзійна гель-хроматографія (SEC), яка також називається хроматографією на проникному гелі (GPC), використовує пористі частинки для поділу молекул різних розмірів. Вона звичайно використовується для поділу полімерних молекул і для визначення молекулярної маси, а також розподілів молекулярної маси полімерів. Молекули, які менші, ніж розмір пори, можуть проникати всередину частинок, і тому робити більш довгий шлях, що займає більший час, ніж більш великі молекули, які не в змозі проникнути всередину частинок. Всі молекули, розміри яких більші, ніж розмір пори, не затримуються і елюються разом. Молекули, які здатні проникнути в пори, мають середній час перебування в частинках, який залежить від розміру і форми молекули. Різні молекули, відповідно, мають різний загальний час проходження через колонку.

До цього часу не розроблено способу кількісного визначення поллоксамерів в зразку білка, в якому білок має молекулярну масу, яка порівнянна з такою поллоксамерів.

Існує, зокрема, необхідність в кількісному визначенні поллоксамерів в зразках білка, в яких білок має молекулярну масу між 5 і 70 кДа (кілодальтон), переважно між 20 і 70 кДа.

Суть винаходу

Даний винахід належить до способу, що забезпечує кількісне визначення поллоксамеру в зразку білка, зокрема, в рідкому зразку білка, наприклад, в рідкому фармацевтичному складі. Зокрема, даний винахід надає спосіб кількісного вимірювання концентрації поллоксамеру в зразку білка. Таким чином, кількість поллоксамеру в складі може бути визначена в будь-який час протягом терміну зберігання білкових складів близько 2 років.

Спосіб кількісного визначення поллоксамеру в рідкому зразку білка включає в себе стадії, в ході яких згаданий зразок піддається:

(а) стадії поділу інгредієнтів згаданого зразка за допомогою колонки ексклюзійної гель-хроматографії; і

(b) стадії детектування поллоксамеру за допомогою аналізу коефіцієнта заломлення;

Переважно, даний винахід належить до способу кількісного визначення поллоксамеру в рідкому зразку білка, що передбачає стадії, в ході яких згаданий зразок піддається:

(а) стадії поділу, за допомогою колонки ексклюзійної гель-хроматографії;

(b) стадії елюції з участю рухоми фаз; і

(c) необов'язково, стадії детектування поллоксамеру.

Таким чином, ексклюзійна гель-хроматографія, скомбінована зі стадією елюції рухливою фазою, дозволяє відділити поллоксамер від інших інгредієнтів.

Поллоксамер детектується в ході наступної стадії шляхом аналізу елюйованої фази, наприклад, з використанням системи детектування RI (коефіцієнта заломлення).

Короткий опис креслень

Фіг. 1 показує хроматограму кількісного визначення Поллоксамеру 188 в складі, що включає hCG. Площа піка Поллоксамеру 188 в цьому прикладі отримана при часі елюції близько 14-16 хвилин (час утримання може варіювати в залежності від швидкості потоку). Площа під криву дозволяє кількісно визначити Поллоксамер 188 в зразку hCG.

Скорочення

У описі даного винаходу використовуються нижченаведені скорочення:

FSH: фолікулостимулюючий гормон;

r-FSH; r-LH; r-hCG; r-GH; r-IFN β r-TSH: рекомбінантний FSH, LH, hCG, GH, INF β , TSH;

hFSH: FSH людини;

r-hFSH: рекомбінантний FSH людини

RI: Коефіцієнт заломлення

KD або Kd або kDa: кілодальтон

SEC: ексклюзійна гель-хроматографія

RT: Кімнатна температура

WFI: вода для ін'єкцій

Поллоксамер 188: синонім Pluronic F68 (фірма BASF Inc.)

Докладний опис винаходу

Даний винахід належить до зручного способу, що забезпечує кількісне визначення поллоксамеру, який являє собою поверхнево-активну речовину, в зразку білка. Переважно, зразок білка являє собою рідкий зразок білка. Рідкий зразок білка може бути в формі якого-небудь рідкого складу, переважно це рідкий фармацевтичний склад, як описано нижче. У одному варіанті втілення, згаданий рідкий фармацевтичний зразок білка міститься в пляшечці для разового або багатодозового введення.

У ще одному варіанті втілення зразок білка для аналізу, висушений заморожуванням, і він повинен бути перед аналізом солюбілізований у прийнятному водному розчиннику.

Спосіб кількісного визначення поллоксамеру в рідкому зразку білка передбачає стадії, в ході яких досліджуваний зразок піддається:

(а) стадії поділу інгредієнтів згаданого зразка за допомогою колонки для ексклюзійної гель-хроматографії (зокрема, колонки SE-HPLC); і

(b) стадії детектування поллоксамеру за допомогою аналізу коефіцієнта заломлення.

Переважно, даний винахід представляє спосіб кількісного визначення поллоксамеру в рідкому зра-

зку білка, що передбачає стадії, в ході яких згаданий досліджуваний зразок піддається:

(а) стадії поділу інгредієнтів за допомогою колонки для ексклюзійної гель-хроматографії;

(b) стадії елюції рухомою фазою; і

(с) необов'язково, стадії детектування полосамеру.

Звичайною колонкою для ексклюзійної гель-хроматографії є колонка SE-HPLC.

У одному варіанті втілення полосамеру являє собою Полосамер 188.

У переважному варіанті втілення білок в рідкому зразку білка має молекулярну масу, яка порівнянна з масою полосамеру.

У особливо переважному варіанті втілення білок в рідкому зразку білка має молекулярну масу між 5 і 70 кДа, більш переважно між 20 і 70 кДа.

Співвідношення маси білка до відповідної маси полосамеру може, переважно, складати між 1:3 і 10:1, переважно між 1:2 і 7:1.

Приклади білків за даним винаходом включають в себе білки ссавців, такі як, наприклад, гормон росту, включаючи в себе гормон росту людини і гормон росту бика; рилізінг-фактор гормону росту; гормон навколотиподібної залози; тереотид-стимулюючий гормон; ліпопротеїни; а-1-антитрипсин; ланцюг А інсуліну; ланцюг В інсуліну; норінсулін; фолікулостимулюючий гормон; хоріонічний гонадотропін; кальцитонін; лютеїнізуючий гормон; глюкагон; фактори згортання, такі як фактор VIIIС, фактор IX, тканинний фактор і фактор фон Віллебранда; протизсідні фактори, такі як білок С; передсердний натрійуретичний фактор; легеневи сурфактант; активатор плазміногену, такий як азурокіназа або активатор плазміногену тканинного типу (t-PA); бомбезин; тромбін; фактор некрозу пухлин- α і - β ; енкефаліназа; RANTES (експресується і виділяється Т-клітинами при активації); запальний протеїн макрофагів людини (MIP-1 α); сироватковий альбумін, такий як сироватковий альбумін людини; антимюллерів гормон; ланцюг А релаксину; ланцюг В релаксину; прорелаксин; білок, пов'язаний з гонадотропін-рилізінг гормоном; ДНКаз; інгібін; активін; фактор росту ендотелію судин (VEGF); рецептори гормонів або факторів росту; інтегрин; білки А або D; ревматоїдні фактори; нейротрофічний фактор, такий як нейротрофічний фактор кісткового мозку (BDNF), нейротрофін-3, -4, -5 або -6 (NT-3, NT-4, NT-5 або NT-6), або фактор росту нервів, такий як NGF-P; тромбоцитарний фактор росту (PDGF); фактор росту фібробластів, такий як aFGF і bFGF, зокрема, FGF-18; епідермальний фактор росту (EGF); трансформуючий фактор росту (TGF), такий як TGF- α і TGF- β , включаючи TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 або TGF- β 5; інсуліноподібний фактор росту-I і -II (IGF-I і IGF-II); дез(I-3)-IGF-I (IGF-I мозку); білки, зв'язуючі інсуліноподібний фактор росту; білки CD, такі як CD3, CD4, CD8, CD19 і CD20; еритропоетин (EPO); тромбопоетин (TPO); остеогенні фактори; остеопонтин; імунотоксини; морфогенетичний білок кістки (BMP); інтерферон, такий як інтерферон - α , - β і - γ ; колонієстимулюючі фактори (CSF), наприклад, M-CSF, GM-CSF і G-CSF; інтерлейкіни (IL), наприклад, IL-1 - IL-10; су-

пероксидисмутаза; рецептори Т-клітин; білки поверхневої мембрани; фактор гемолізу (DAF); вірусний антиген, такий як, наприклад, частина оболонки вірусу набутого імунodefіциту (AIDS); транспортні білки; "хомінг"-рецептори; адресний; регуляторні білки; імуноадгезини; антитіла; і біологічно активні фрагменти або варіанти якого-небудь з перерахованих поліпептидів.

Переважно, білки за даним винаходом вибрані з фолікулостимулюючого гормону (FSH), хоріонічного гонадотропіну (CG), лютеїнізуючого гормону (LH), інтерферону- β (IFN- β), пегільованого інтерферону- β (PEG-IFN- β), гормону росту (GH), тереотид-стимулюючого гормону (TSH), фактор росту-18 фібробластів (FGF-18) або остеопонтину.

FSH, CG, LH і TSH є глікопротеїнами, що належить до класу гонадотропінів. Гонадотропіни використовують в лікуванні безпліддя.

IFN- β є глікопротеїном, що належить до класу інтерлейкінів. IFN- β використовують в лікуванні розсіяного склерозу.

PEG-IFN- β являє собою IFN- β , дериватизований ланцюгом поліетиленгліколю, який додає підвищеної стабільності.

Гормон росту є неглікозильованим білком. Він застосовується в лікуванні дітей або дорослих з дефіцитом гормону росту.

FGF-18 застосовують в лікуванні остеоартрити.

Остеопонтин є глікозильованим одноланцюжковим поліпептидом.

У одному переважному варіанті втілення згаданий білок являє собою гетеродимер, такий як гонадотропіни (FSH, LH, CG, TSH, а також варіанти). У ще одному варіанті втілення білок являє собою гормон росту (GH) або інтерферон- β (IFN- β або варіанти, наприклад, пегільовані варіанти). У ще одному варіанті втілення, білок являє собою FGF-18 або остеопонтин.

У переважному варіанті втілення, рідкий зразок білка включає в себе один або більше терапевтичних білків. Переважно, такий зразок не включає в себе небілковий терапевтичний засіб, такий як низькомолекулярні хімічні сполуки.

Фолікулостимулюючий гормон або FSH, оскільки це використовується в даному документі, означає FSH, продукований як повнорозмірний зрілий білок, який включає в себе, але не обмежується або, FSH людини або «hFSH», або продукований він рекомбінантно або виділений з людини як джерела, такого як сеча постменопаузних жінок.

Спосіб придатний для природних, так само як і рекомбінантних білків. У одному варіанті втілення склад білка являє собою рекомбінантний FSH, LH, CG, TSH, GH або IFN- β людини.

Фолікулостимулюючий гормон (FSH) являє собою глікопротеїн, що належить до класу гонадотропінів. FSH застосовують при лікуванні безпліддя і порушень функції відтворення у пацієнтів як жіночої, так і чоловічої статі, наприклад, для індукції сперматогенезу у чоловіків, страждаючих олігоспермією.

Лютеїнізуючий гормон (LH) являє собою гонадотропін, секретований передньою долею гіпофізу. LH застосовують в комбінації з FSH у пацієнтів

жіночої статі при індукції овуляції (OI) і в контрольованій гіперстимуляції яєчників (COH), особливо у тих пацієнтів, які мають дуже низький рівень ендогенного LH або володіють резистентністю до LH, таких як жінки, які страждають на гіпогонадотрофний гіпогонадізм (НН, Всесвітня Організація Охорони здоров'я (WHO) група I) або у немолодих пацієнтів (наприклад, 35 років і старше), а також у пацієнток, що мають проблеми з імплантацією зародка або з раннім викиднем.

Хоріонічний гонадотропін (CG) являє собою гонадотропін, продукований плацентою і отриманий з сечі вагітних жінок. CG діє на той самий рецептор, що і LH, і викликає ті ж самі реакції. CG володіє більш тривалим часом півжиття при циркуляції, ніж LH, і тому звичайно використовується як довготривале діюче джерело активності LH. CG застосовують при режимах OI і COH з метою імітувати природний пік LH і запустити овуляцію. Ін'єкція хоріонічного гонадотропіну людини (hCG) застосовується для запуску овуляції в кінці стимуляції за допомогою FSH або суміші FSH і LH. CG може також бути використаний разом з FSH в ході стимуляції для OI і COH, з метою забезпечити активність LH в ході стимуляції у пацієнток, у яких бажана активність LH, таких як згадані вище.

FSH, LH і CG є членами сімейства гетеродимерних глікопротеїнових гормонів, яке також включає в себе тереоїд-стимулюючий гормон (TSH). Члени цього сімейства є гетеродимерами, що включають в себе α - і β -субодиниці. Субодиниці пов'язані нековалентними взаємодіями. Гетеродимер FSH людини (hFSH) складається зі (i) зрілої α -субодиниці глікопротеїну, що містить 92 амінокислоти, яка також є спільною для інших членів цього сімейства у людини (тобто хоріонічний гонадотропін («CG»), лютеїнізуючий гормон («LH») і тереоїд-стимулюючий гормон («TSH»); і (ii) зрілої β -субодиниці, що містить 111 амінокислот, яка унікальна для FSH. Гетеродимер LH людини складається з (i) зрілої α -субодиниці глікопротеїну, що містить 92 амінокислоти; і (ii) зрілої β -субодиниці, що містить 112 амінокислот, яка унікальна для LH. α - і β -субодиниці глікопротеїнів можуть бути схильні до дисоціації в сполуках внаслідок взаємодії з консервантом, поверхнево-активною речовиною і іншими експіцієнтами. Дисоціація субодиниць веде до втрати біологічної активності.

FSH готують в сполуках для внутрішньом'язової (IM) або підшкірної (SC) ін'єкції. У одному варіанті втілення FSH постачається в ліофілізованій (твердій) формі в пляшечках або ампулах 75 міжнародних одиниць (МО)/пляшечка і 150 МО/пляшечка з часом зберігання півтора року і

два роки, якщо зберігається при 2-25°C. Розчин для ін'єкції отримують шляхом розбавлення ліофілізованого продукту у воді для ін'єкцій (WFI). До того ж, рідкі склади FSH доступні (Gonal-F pen) із вмістом 22 мкг/0,5 мл, 33 мкг/0,75 мл або 66 мкг/1,5 мл FSH, а також Полоксамеру 188, сахарози, буфера, метіоніну і м-крезолу.

Отже, FSH готують як в однодозовій, так і в багатодозовій формах, в пляшечках або ампулах. Однодозові форми повинні залишатися стабільними і дієвими при зберіганні до використання. Багатодозові форми повинні не тільки залишатися стабільними і дієвими при зберіганні до використання, але також повинні залишатися стабільними і дієвими і відносно вільними від бактерій протягом періоду багатодозового введення після того як герметичність ампули була порушена. З цієї причини багатодозові форми звичайно містять бактеріостатичний агент, наприклад, бензиловий спирт або м-крезол.

LH готують в сполуках для внутрішньом'язової (IM) або підшкірної (SC) ін'єкції. LH постачають в ліофілізованій (твердій) формі в пляшечках або ампулах по 75 МО/пляшечка з часом зберігання від півтора до двох років при 2-25°C. Розчин для ін'єкції отримують розбавленням ліофілізованого продукту водою для ін'єкцій (WFI). Luveris™ містить крім LH наступні експіцієнти: сахарозу, буфер, Polysorbat 20, метіонін. Останнім часом описані склади LH, що містять Полоксамер 188 (WO 2004/087213).

Рідкі фармацевтичні композиції, що містять hCG, також присутні на ринку, наприклад, Ovitrelle™, що містить манітол в фосфатному буфері при pH 7, метіонін, Полоксамер 188.

Вираз «варіант» призначений охопити такі молекули, які відрізняються по послідовності амінокислот, типу глікозилювання або з'єднанню між субодиницями від FSH, LH, CG, TSH, IFN- β або GH людини, але що виявляють відповідну біологічну активність FSH, LH, CG, TSH, IFN- β або GH. Приклади включають в себе CTP-FSH, рекомбінантний FSH з пролонгованою дією, що містить α -субодиницю дикого типу і гібридну β -субодиницю, в якій карбосикінцевий пептид hCG сполучений з C-кінцем β -субодиниці FSH, як описано в LaPolt et al; Endocrinology; 1992, 131, 2514-2520; or Klein et al.; Development and characterization of a long-acting r-hFSH agonist; Human Reprod. 2003, 18, 50-56]. Також включений одноланцюжковий CTP-FSH, одноланцюжкова молекула, що складається з наступних послідовностей (від N-кінця до C-кінця):

β FSH	phCG-CTP(I 13-145)	α FSH
-------------	--------------------	--------------

в якій β FSH означає β -субодиницю FSH, β hCG CTP (113-145) означає карбоксильний кінець пептиду hCG, а α FSH означає α -субодиницю FSH, як описано в Klein et al; (Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotrophin carboxy terminal

peptide in the rhesus monkey, Fertility & Sterility, 2002, 77, 1248-1255). Інші приклади варіантів FSH включають в себе молекули FSH, що мають додаткові сайти глікозилювання, включені в α - і/або β -субодиницю, як описано в WO 01/58493 (фірма Maxugen), особливо, як описано в пп. 10 і 11 WO

01/58493, і молекули FSH з S-S-зв'язками між субодинами, як описано в WO 98/58957.

Варіанти FSH, що згадуються в даному документі, також включають в себе делеції карбоксильного кінця β -субодинами, яка коротша, ніж повнорозмірний зрілий білок FSH. Гетеродимери FSH або варіанти гетеродимерів FSH можуть бути отримані будь-яким відповідним способом, таким як рекомбінантний, шляхом виділення або очищення з природних джерел, що може бути найбільш вірним, або шляхом хімічного синтезу, або якою-небудь їх комбінацією.

«Варіанти» також включають в себе пегильовані форми білків.

Використання терміну «рекомбінантний» належить до препаратів FSH, LH, CG, TSH, GH, IFN- β або варіантів, які отримані за допомогою рекомбінантної ДНК-технології (див., наприклад, WO 85/01958). Один з прикладів способу експресування FSH або LH за допомогою рекомбінантної технології - це трансфекція еукаріотних клітин послідовностями ДНК, що кодують α - і β -субодинами FSH або LH, незалежно від того, на одному векторі або на двох векторах для кожної субодинами, що мають окремі промотори, як описано в Європейських патентах №№ EP 0211894 і EP 0487512. Іншим прикладом застосування рекомбінантної технології для отримання FSH або LH є використання гомологічної рекомбінації для вставки гетерологічного регуляторного сегмента в оперативній сполучі з ендогенними послідовностями, що кодують субодинами FSH або LH, як описано в Європейському патенті № EP 0505500 (фірма Applied Research Systems ARS Holding NV).

FSH або варіант FSH, що використовуються відповідно до даного винаходу, можуть бути отримані не тільки рекомбінантними засобами, включаючи в себе такі на клітинах ссавців, але також можуть бути очищені з інших біологічних джерел, таких як сеча. Прийнятні методології включають в себе такі, описані в Nakola, K. Molecular and Cellular Endocrinology, 127:59-69, 1997; Keene, et al., J. Biol. Chem., 264: 4769-4775, 1989; Cerpa-Poljak, et al., Endocrinology, 132: 351-356, 1993; Dias, et al., J. Biol. Chem., 269:25289-25294, 1994; Flack, et al., J. Biol. Chem., 269:14015-14020, 1994; i Valove, et al., Endocrinology, 135:2657-2661, 1994, патент США 3119740 і патент США № 5767067.

Термін «лютеїнізуючий гормон» або LH, так, як він використовується в даному документі, належить до LH, отриманому як повнорозмірний зрілий білок, який включає в себе, але не обмежується ним, LH людини, або отриманий він рекомбінантно або виділений з джерел людського походження, таких як сеча постменопаузних жінок. Білкова послідовність α -субодинами глікопротеїну людини представлена в SEQ ID NO: 1, а білкова послідовність β -субодинами LH людини подана в SEQ ID NO: 6. У переважному варіанті втілення LH є рекомбінантним.

Вираз «варіант LH» призначений, щоб охопити такі молекули, які відрізняються по амінокислотній послідовності, типу глікозилювання або зв'язку між субодинами LH людини, але виявляють активність LH.

Гетеродимери LH або гетеродимери варіантів LH можуть бути отримані яким-небудь відповідним способом, таким як рекомбінантний, шляхом виділення або очищення з природних джерел, що найбільш звичайно, або шляхом хімічного синтезу, або якої-небудь їх комбінації.

Рідкі зразки білків за даним винаходом також включають в себе суміші FSH/LH і варіанти (WO 2004/087213), так само як FSH і hCG, і варіанти (WO 2004/105788).

Термін «водний розріджувач» належить до рідкого розчину, який містить воду. Водні розчинні системи можуть складатися тільки з води або можуть складатися з води з додаванням одного або більше змішуваних розчинів і можуть містити розчинені речовини, такі як цукор, буфери, солі або інші наповнювачі. Більш звичайними у використанні неводними розчинниками є органічні спирти з короткими ланцюгами, такі як, метанол, етанол, пропанол, кетон з короткими ланцюгами, такі як ацетон, і багатоосновні спирти, такі як гліцерин.

Термін «бактеріостатик» або «бактеріостатичний агент» належить до сполуки або композиції, доданих до складу, щоб діяти як антибактерійний агент. Склади, що містять FSH або варіант FSH, або FSH і LH з консервантом за даним винаходом, переважно відповідають законним або регулюючим правилам для ефективності консерванту, щоб бути комерційно життєздатним продуктом багаторазового використання, переважно на людині. Приклади бактеріостатиків включають в себе фенол, м-крезол, п-крезол, о-крезол, хлоркрезол, бензиловий спирт, алкілапарабен (метил, етил, пропіл, бутіл і подібне), бензалконію хлорид, бензетонію хлорид, дегідроацетат натрію і тимеросал.

Термін «буфер» або «фізіологічно прийнятний буфер» належить до розчинів сполук, які відомі як безпечні для фармацевтичного або ветеринарного застосування в складах і які мають ефект підтримки або контролю рН складу в бажаному для складу діапазоні рН. Прийнятні для контролю рН на рівні помірного кислого рН помірно основного рН буфери включають в себе, але не обмежуються ними, такі речовини, як фосфат, ацетат, цитрат, аргінін, TRIS і гістидин. «TRIS» означає 2-аміно-2-гідроксиметил-1,3-пропандіол і деякі його фармакологічно прийнятні солі. Переважні буфери являють собою фосфатні буфери з фізіологічним розчином або прийнятною сіллю.

Термін «фосфатний буфер» належить до розчинів, що містять фосфорну кислоту або її солі, встановлених на бажаному рівні рН. Загалом, фосфатні буфери готують з фосфорної кислоти або солей фосфорної кислоти, включаючи в себе, але, не обмежуючись ними, натрієву і калієву солі. Деякі солей фосфорної кислоти відомі в даній галузі техніки, такі як одноосновний натрій і калій, двоосновні і триосновні солі кислоти. Також відомо, що солі фосфорної кислоти зустрічаються як гідрати солей, що зустрічаються. Фосфатні буфери можуть охоплювати діапазон рН, такий як від близько рН 4 до близько рН 10, а переважні діапазони від близько рН 5 до близько рН 9, а найбільш переважним є діапазон від 6,0 або близько того до

8,0 або близько того, найбільш переважно -pH 7,0 або близько того.

Термін «пляшечка» належить в широкому значенні до резервуара, придатного, щоб містити FSH в твердій або рідкій формі в стерильному стані. Приклади пляшечок, як вони вживаються в даному документі, включають в себе ампули, касети, блістерні упаковки або інші такі ємності, придатні для введення FSH пацієнту за допомогою шприца, насоса (включаючи в себе осмотичний), катетер, трансдермальний пластр, легневий спрей або спрей для слизової. Пляшечки, придатні для упакування продуктів для парентерального, легневого, через слизову або трансдермального введення відомі і визнані в даній галузі техніки.

Вираз «багатодозове застосування» призначений, щоб включити в себе використання однієї пляшечки, ампули або касет із складом FSH або складом білка для більш ніж однієї ін'єкції, наприклад, 2, 3, 4, 5, 6 або більше ін'єкцій. Ін'єкції проводять переважно в період щонайменше 12 годин, 24 годин, 48 годин і т.д. або близько того, переважно в період 12 днів або близько того. Ін'єкції можуть бути розділені проміжками часу, наприклад, в 6, 12, 24, 48 або 72 години.

Термін «стабільність» належить до фізичної, хімічної і конформаційної стабільності даного білка в складі за даним винаходом (включаючи в себе підтримку біологічної активності). Нестабільність складу білка може бути викликана хімічним розкладанням або агрегацією молекул білка з утворенням полімерів більш високого порядку, дисоціацією гетеродимерів в мономери, деглікозилюванням, модифікацією глікозилювання, окисленням (особливо в гетеродимерах α -субодиниці) або якою-небудь іншою структурною модифікацією, яка зменшує щонайменше один вид біологічної активності поліпептиду, включеного в даний винахід.

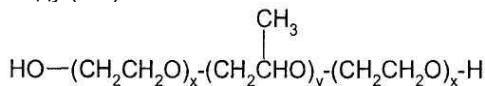
«Стабільний» розчин або склад є таким, в якому міра розкладання, модифікації, агрегації, втрати біологічної активності і подібного білків в розчині або складі прийнятним чином контролюється і не зростає неприйнятним чином з плином часу. Переважно, склад зберігає щонайменше 80% або близько того активність згаданого білка в період до 2 років.

Проблема, яка лежить в основі даного винаходу, полягає в тому, щоб надати зручний і швидкий спосіб визначення кількості полосамеру в зразку білка. Полосамер може бути використаний як поверхнево-активна речовина і вибирається з блоку-співполімерів етиленоксиду і пропіленоксиду, переважно Pluronic F77, Pluronic F87, Pluronic F88 і Pluronic F68, особливо переважно Pluronic F68 (фірма BASF, Pluronic F68 також відомий як Полосамер 188).

Як згадувалося вище, фармацевтичні складки повинні мати час зберігання до 2 років при температурі зберігання 2-25°C. Це має на увазі, що склад залишається стабільним протягом цього часу. Оскільки рідкі складки містять різні наповнювачі, які можуть впливати безпосередньо або опосередковано через розкладання на стабільність складу білка, існує необхідність в аналітичному

інструменті, щоб добитися згаданої стабільності складу.

Більш конкретно, полосамерні поверхнево-активні речовини є блок-співполімерами етиленоксиду (EO) і пропіленоксиду (PO). Блок пропіленоксиду (PO) укладений між двома блоками етиленоксиду (EO).



EO	PO	EO
----	----	----

Полосамери синтезують в двостадійному процесі:

- Гідрофобна речовина бажаної молекулярної маси утворюється шляхом контрольованого додавання пропіленоксиду до двох гідроксильних груп поліенгліколю; і

- Етиленоксид додавали до сендвічу гідрофобної речовини між гідрофільними групами.

Полосамерні поверхнево-активні речовини також відомі як плуроніки.

У Pluronic F77 процент поліоксиетилену (гідрофільного) становить 70%, і молекулярна маса гідрофобної речовини (поліоксипропілен) становить приблизно 2306 Да.

У Pluronic F87 процент поліоксиетилену (гідрофільного) становить 70%, і молекулярна маса гідрофобної речовини (поліоксипропілен) становить приблизно 2644 Да.

У Pluronic F88 процент поліоксиетилену (гідрофільного) становить 80%, і молекулярна маса гідрофобної речовини (поліоксипропілен) становить приблизно 2644 Да.

У Pluronic F68 процент поліоксиетилену (гідрофільного) становить 80%, і молекулярна маса гідрофобної речовини (поліоксипропілен) становить приблизно 1967 Да.

Типові властивості Pluronic F77 перераховані нижче:

Середня молекулярна маса: 6600;

Температура плавлення/застигаючого: 48°C;

Фізична форма при 20°C: тверда;

В'язкість (Brookfield) сантипуаз: 480 [рідини при 25°C, пастоподібні при 60°C і тверді при 77°C];

Поверхневе натягнення, дин/см 25°C;

конц. 0,1%: 47,0

конц. 0,01%: 49,3

конц. 0,001%: 52,8

Натягнення на межі поділу фаз, дин/см 25°C проти Nujol;

конц. 0,1%: 17,7

конц. 0,01%: 20,8

конц. 0,001%: 25,5

Час змочування по Дрейвзу, секунд при 25°C

конц. 1,0%: >360

конц. 0,1%: >360

Висота піни

Проба Росса і Майльса на піноутворюючу здатність, 0,1%, мм, 50°C: 100

Проба Росса і Майльса на піноутворюючу здатність, 0,1%, мм, 26°C: 47

Динамічна, 0,1%, мм, 400 мл/хв: >600

Температура помутніння у водному розчині, °C

Конц. 1%: >100
 Конц. 10%: >100
 HLB (гідрофільно-ліпофільний баланс): 25
 Типові властивості Pluronic F87 перераховані нижче:
 Середня молекулярна маса: 7700;
 Температура плавлення/застигаючого: 49°C;
 Фізична форма при 20°C: тверда;
 В'язкість (Brookfield) сантипуаз: 700 [рідини при 25°C, пастоподібні при 60°C і тверді при 77°C];
 Поверхнєве натягнення, дин/см 25°C;
 Конц. 0,1%: 44,0
 Конц. 0,01%: 47,0
 Конц. 0,001%: 50,2
 Натягнення на межі поділу фаз, дин/см, 25°C проти Nujol;
 Конц. 0,1%: 17,4
 Конц. 0,01%: 20,3
 Конц. 0,01%: 23,3
 Час змочування по Дрейвзу, секунд при 25°C
 Конц. 1,0%: >360
 Конц. 0,1%: >360
 Висота піни
 Проба Росса і Майльса на піноутворюючу здатність, 0,1%, мм, 50°C: 80
 Проба Росса і Майльса на піноутворюючу здатність, 0,1%, мм, 26°C: 37
 Динамічна, 0,1%, мм, 400 мл/хв: >600
 Температура помутніння у водному розчині, °C
 Конц. 1%: >100
 Конц. 10%: >100
 HLB (гідрофільно-ліпофільний баланс): 24
 Типові властивості Pluronic F88 перераховані нижче:
 Середня молекулярна маса: 11400;
 Температура плавлення/застигаючого: 54°C;
 Фізична форма 20°C: тверда;
 В'язкість (Brookfield) сантипуаз: 2300 [рідкі при 25°C, пастоподібні при 60°C і тверді при 77°C];
 Поверхнєве натягнення, дин/см 25°C;
 Конц. 0,1%: 48,5
 Конц. 0,01%: 52,6
 Конц. 0,001%: 55,7
 Натягнення на межі поділу фаз, дин/см, 25°C проти Nujol;
 Конц. 0,1%: 20,5
 Конц. 0,01%: 23,3
 0,01%: 27,0
 Час змочування по Дрейвзу, секунд при 25°C
 Конц. 1,0%: >360
 Конц. 0,1%: >360
 Висота піни
 Проба Росса і Майльса на піноутворюючу здатність, 0,1%, мм, 50°C: 80
 Проба Росса і Майльса на піноутворюючу здатність, 0,1%, мм, 26°C: 37
 Динамічна, 0,1%, мм, 400 мл/хв: >600
 Температура помутніння у водному розчині, °C
 Конц. 1%: >100
 Конц. 10%: >100
 HLB (гідрофільно-ліпофільний баланс): 28
 Типові властивості Pluronic F68 перераховані нижче:
 Середня молекулярна маса: 8400;
 Температура плавлення/застигаючого: 52°C;

Фізична форма 20°C: тверда;
 В'язкість (Brookfield) сантипуаз: 1000 [рідкі при 25°C, пастоподібні при 60°C і тверді при 77°C];
 Поверхнєве натягнення, дин/см 25°C;
 Конц. 0,1%: 50,3
 Конц. 0,01%: 51,2
 Конц. 0,001%: 53,6
 Натягнення на межі поділу фаз, дин/см, 25°C в порівнянні з Nujol;
 Конц. 0,1%: 19,8
 Конц. 0,01%: 24,0
 Конц. 0,01%: 26,0
 Час змочування по Дрейвзу, секунд при 25°C
 Конц. 1,0%: >360
 Конц. 0,1%: >360
 Висота піни
 Проба Росса і Майльса на піноутворюючу здатність, 0,1%, мм 50°C: 35
 Проба Росса і Майльса на піноутворюючу здатність, 0,1%, мм 26°C: 40
 Динамічна, 0,1%, мм 400 мл/хв: >600
 Температура помутніння у водному розчині, °C
 Конц. 1%: >100
 Конц. 10%: >100
 HLB (гідрофільно-ліпофільний баланс): 29
 Інші полуксамерні полімери, що мають властивості, схожі з такими, які перераховані вище, також можуть бути використані в сполуках за даним винаходом. Переважною полуксамерно поверхнево-активною речовиною, присутньою в складі білка, які аналізуються даним способом, є Pluronic F68 (= Полуксамер 188).
 Переважно концентрація Pluronic, особливо Pluronic F68, в рідких складах білка складає від 0,01 мг/мл або близько того до 1 мг/мл або близько того, більш переважно від 0,05 мг/мл або близько того до 0,5 мг/мл або близько того, особливо більш переважно від 0,2 мг/мл або близько того до 0,4 мг/мл або близько того, найбільш переважно 0,1 мг/мл або близько того.
 Склади білка, що аналізуються відповідно до способу за даним винаходом, мають рН між 6,0 або близько того і 8,0 або близько того, більш переважно від 6,8 або близько того до 7,8 або близько того, включаючи в себе рН близько 7,0, рН 7,2 і 7,4. Переважним буфером є фосфат, з переважним протиіоном, що є іоном натрію або калію. Фосфатні сольові буфери добре відомі в даній галузі техніки, такі як фосфатний сольовий буфер Дульбекко. Концентрації буферів в сумарному розчині можуть варіювати між 5 мМ, 9,5 мМ, 10 мМ, 50 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ, 250 мМ і 500 мМ або близько того. Переважно, концентрація буфера становить 10 мМ або близько того. Особливо переважний буфер 10 мМ з іонами фосфату і рН 7,0.
 Переважно, складі FSH, що аналізуються відповідно до способу за даним винаходом, мають рН між 6,0 або близько того і 8,0 або близько того, більш переважно - від 6,8 або близько того до 7,8 або близько того, включаючи в себе рН близько 7,0, рН 7,2 і 7,4. Переважним буфером є фосфат з переважними протиіонами, що є іонами натрію або калію.
 Переважно, складі сумішей FSH і LH, що аналізуються відповідно до способу за даним винаходом,

дом, мають рН між 6,0 або близько того і 9,0 або близько того, більш переважно від 6,8 або близько того до 8,5 або близько того, включаючи в себе рН близько 7,0, рН 8,0 і 8,2, найбільш переважно на рівні рН 8,0 або близько того.

Переважно, склади hCG, що аналізуються відповідно до способу за даним винаходом, мають рН між 6,0 або близько того і 8,0 або близько того, більш переважно між 6,8 або близько того і 7,8 або близько того, включаючи в себе рН близько 7,0, рН 7,2 і 7,4.

Зразок білка переважно являє собою рідкий склад для разового або багаторазового введення. Рідкі склади за даним винаходом, які призначені для багаторазового застосування, переважно включають в себе бактеріостатик, такий як фенол, м-крезол, п-крезол, о-крезол, хлоркрезол, бензиловий спирт, алкілпараамінобензойної кислоти (метил, етил, пропіл, бутіл і ним подібне), тимол, бензалконію хлорид, бензетонію хлорид, дегідроацетат натрію і тимеросал. Особливо переважними є фенол, бензиловий спирт і м-крезол, більш переважними є фенол і м-крезол, найбільш переважним є м-крезол. Бактеріостатичний агент використовують в кількості, яка дає концентрацію, ефективну для підтримки складу загалом вільного від бактерій (придатної для ін'єкції) в період багаторазових ін'єкцій, який може складати від 12 або 24 години або близько того до 12 або 14 днів або близько того, переважно від 6 днів або близько того до 12 днів або близько того. Бактеріостатик переважно присутній в концентрації від 0,1% або близько того (маса бактеріостатика/маса розчинника) до 2,0% або близько того, більш переважно на рівні 0,2% або близько того до 1,0% або близько того. У разі бензилового спирту, особливо переважною є концентрація 0,9%). У разі фенолу, особливо переважною є концентрація 0,5% або близько того. У разі м-крезолу, особливо переважною є концентрація 0,3% або близько того (наприклад, на рівні 3 мг/мл або близько того в WFI).

Колонки для ексклюзивної гель-хроматографії добре відомі фахівцям в даній галузі техніки. Їх вибирають виходячи з відповідного білка і полксамеру в зразку. Гель в колонці повинен бути матрицею на полімерній основі. Переважною колонкою є колонка SE-HPLC, що має позначення TSK G3000PW фірми TosoHaas Inc. Кульки матриці мають розмір частинок 10 або 17 мкм, розмір пор близько 200Å. Колонка комерційно доступна.

Стадія визначення може бути виконана за допомогою якої-небудь системи визначення RI, яка відома фахівцям в даній галузі техніки.

Було виявлено, що в більш кислих умовах полксамер може бути більш легко відділений від білків.

Таким чином, рухома фаза, що використовується відповідно до способу за даним винаходом, являє собою водний розчинник, такий як вода або буферний розчин.

У конкретному варіанті втілення, рН рухомої фази встановлюють на рівні нижче ніж 7, переважно нижче ніж 3, більш переважно - між близько 1,6 і 2,0, а найбільш переважно між 1,9 і 2,0. У одному варіанті втілення білок являє собою гетеродимер, такий як FSH, CG, LH або TSH. У кислих умовах гетеродимерний білок схильний до розпаду на субодиниці, які рухаються більш легко, поліпшуючи таким чином стадії поділу і детектування (розрізнення). Кислотні агенти, придатні для встановлення рН, можуть бути підібрані фахівцями в даній галузі техніки. Найбільш переважною кислотою є трифтороцтова кислота (TFA).

Звичайно, зразки, які повинні бути визначені, готують і ін'єктують в колонку. Що стосується коефіцієнта заломлення на стадії детектування за даному способом, отримували хроматограму, що містить площу піка полксамеру, так само як і щонайменше ще один пік відповідний білку (білкам) і наповнювачам. Оцінка площі піка дозволяє кількісну оцінку полксамеру, присутнього в зразку, що аналізується. Кількісне визначення можливе, оскільки готували стандартну криву полксамерів (див. Приклади).

Приклади

Тут даний винахід буде проілюстрований за допомогою Прикладів.

Приклад (ілюстрований Фіг. 1)

Метою даного Прикладу було проаналізувати концентрацію Полксамеру 188 в зразку комерційно доступного рідкого складу hCG Ovitrelle™ через 18 місяців зберігання при кімнатній температурі. Таким чином, оцінювали стабільність рідкого складу по відношенню до Полксамеру 188. Концентрація полксамеру 188 в момент виготовлення складала близько 100 мкг/мл. Протокол кількісного визначення Полксамеру 188 в Ovitrelle™ був наступним.

Рідкий ін'єкційний Ovitrelle™ містив наступні інгредієнти: хоріонічний гонадотропін-α, маніт, L-метіонін, Полксамер 188, фосфорна кислота, NaOH і вода.

1. Обладнання і матеріали

HPLC ALLIANCE mod. 269
 Детектор RI мод. 2414 BASF
 Підтримка по математичному забезпеченню
 Персональний комп'ютер
 Полксамер 188 Lutrol F68 код 010293-1
 Трифтороцтова кислота (TFA) код. 9470 (10(1 мл)
 Аналітична колонка TSKgel G3000 PWxl код 08021
 D(-)Маніт код 1.05983
 L-Метіонін код 1.05707
 Орто-Фосфорна кислота 85% код 1.00573

Постачальник
 Waters
 Waters
 Waters
 IBM (або еквівалентний)
 BASF
 J.T.Baker
 TOSOH
 MERCK
 MERCK
 MERCK

Гідроксид натрію 50% код 7067
Етанол градієнтної чистоти код 1.11727
Шприци Ovitrelle - рідкий склад hCG 250 мкг

J.T. Baker
MERCK
SERONO

2. Процедура

2.1 Елюент А (H₂O/TFA 0,5%)

До 950 мл очищеної води в 1 літровому граду-йованому циліндрі додавали 5 мл трифтороцетної кислоти (TFA) і при перемішуванні доводили до 1000 мл. рН елюенту складав між 1,7 і 1,9.

2.2 Елюент В (20% Етанол)

До 750 мл очищеної води в 1 літровому граду-йованому циліндрі додавали 200 мл етанолу і до-водили при перемішуванні до 1000 мл.

2.3 Відмитий розчин для автоматичної піпетки для відбору проб (10% Метанол)

До 850 мл очищеної води в 1 літровому граду-йованому циліндрі додавали 100 мл метанолу і доводили при перемішуванні до 1000 мл.

2.4 Розчинник для закупорювання (5% Метанол)

До 900 мл очищеної води в 1 літровому граду-йованому циліндрі додавали 50 мл метанолу і до-водили при перемішуванні до 1000 мл.

2.5 Розчин для стандартної кривої розбавлен-ня (рідкий склад без Полоксамеру 188)

До 850 мл очищеної води в 1 літровому граду-йованому циліндрі додавали 54,6 г D(-)-маніту, 0,98г 85%-ний ортофосфорної кислоти і 200 мкг L-метіоніну. Розчин доводили до рН 7,0 краплинним доданням 50% гідроксиду натрію і доводили до 1мл. Розчин фільтрували через фільтр 0,45 мкм.

Як альтернатива як розчин для стандартної кривої розбавлення може бути використана вода.

2.6 Концентрований розчин для стандартної кривої

температура детектора RI
температура колонки:
швидкість потоку через колонку
швидкість потоку Elium:

температура автоматичної піпетки для відбо-ру проб

Петля автоматичної піпетки для відбору проб

Розмір шприца:

Тривалість аналізу:

Наступна ін'єкція:

200 мг Полоксамеру 188 розчиняли в 80 мл очищеної води в градуйованому циліндрі на 100мл і доводили до 100 мл. Стандартну криву готували, основуючись на очікуваній концентрації в зразку, що аналізується. У цьому Прикладі в рідкому ін'єкційному Ovitrelle™ концентрація Полоксамеру 188 очікувалася близько 100 мкг/мл, таким чином, стан-дартна крива побудована в діапазоні 50-160 мкг/мл.

3 Приготування зразків

Пустий зразок

Ін'єктували 0,05 мл розчини для стандартної кривої розбавлення.

Зразки

Всі зразки тестували без якої-небудь поперед-ньої обробки, і ін'єктували 0,05 мл.

4. Експлуатаційні умови

4.1. Набір інструментів

Нижченаведені розчини подавали в лінії HPLC:

Лінія А: Елюент А (H₂O/TFA 0,5%)

Лінія В: Елюент В (Етанол 20%)

Лінії А і В заповнювали, систему продували і промивали при швидкості потоку 2 мл/хв протягом 3 хвилин. Включали вбудований дегазатор, при наявності такого.

Перед аналізом соленоїдний клапан детектора RI потоку включали в режимі продування щонай-менше на 30 хвилин на лінії А. Продування прото-чного елементу виконували для впускання свіжої рухомої фази в еталонну частину елементу.

З'єднання колонки з інструментами і введення наступних параметрів:

30°C
+20±5°C
0,5 мл/хв
20 мл/хв (у разі відсутності в лінії дега-затора)
+4°C

200 мкл

250 мкл

40 хв

5 хв

4.2 Урівноваження колонки

Колонку промивають елюентом А для урівно-важення колонки. Урівноваження закінчується, коли базова лінія стає стабільною.

4.3 Зберігання колонки

Після завершення аналізу колонку промива-ють щонайменше 30 мл очищених води, після чого 30 мл 20% етанолу.

4.4 Визначення концентрації Полоксамеру 188 в зразках Ovitrelle

Моделлю, використаною для розрахунку кон-центрації Полоксамеру 188 в зразках Ovitrelle, є лінійна регресія.

$Y=a+bx$,
у якому

Y = загальна площа піка Полоксамеру 188

a = величина відрізка

b = величина кута нахилу

x = концентрація Полоксамеру 188 в мкг/ін'єктований мл.

Піки зразка інтегрували, як показано на Фіг. 1.

Величина відрізка (a) і кут нахилу (b) стан-дартної кривої розраховували, за допомогою матема-тичного забезпечення Statgraphics plus розрахову-вали лінійну регресію.

Наступну формулу застосовували для розра-хунку концентрації Полоксамеру 188.

$$C_{\text{полоксамер 188}} = \frac{y-a}{b} * FD \quad (FD = \text{показник розбавлення})$$
 Рівняння 1

Рішення рівняння 1 дає концентрацію Полоксамеру 188 в кожному із зразків Ovitrelle, виражену в мкг/мл.

Концентрація полоксамеру, виявлена в зразках за даному Прикладом (див. Фіг.1) склала близько 94 мкг/мл.

Приклад 2

Мета цього Прикладу полягає в тому, щоб проаналізувати концентрацію Полоксамеру 188 в зразку комерційно доступного рідкого складу hFSH - Gonal-F RFF Pen™ через 18 місяців зберігання при кімнатній температурі. Таким чином, була оцінена стабільність рідкого складу, що стосується Полоксамеру 188. Концентрація Полоксамеру 188 в момент приготування складала близько 100мкг/мл. Протокол кількісного визначення Полоксамеру 188 в Gonal-F RFF Pen™ був ідентичний показаному в Прикладі 1 для Ovitrelle, за винятком

того, що швидкість потоку через колонку становила 0,75 мл/хв. Полоксамер міг бути відділений від hFSH і кількісно визначений окремо.

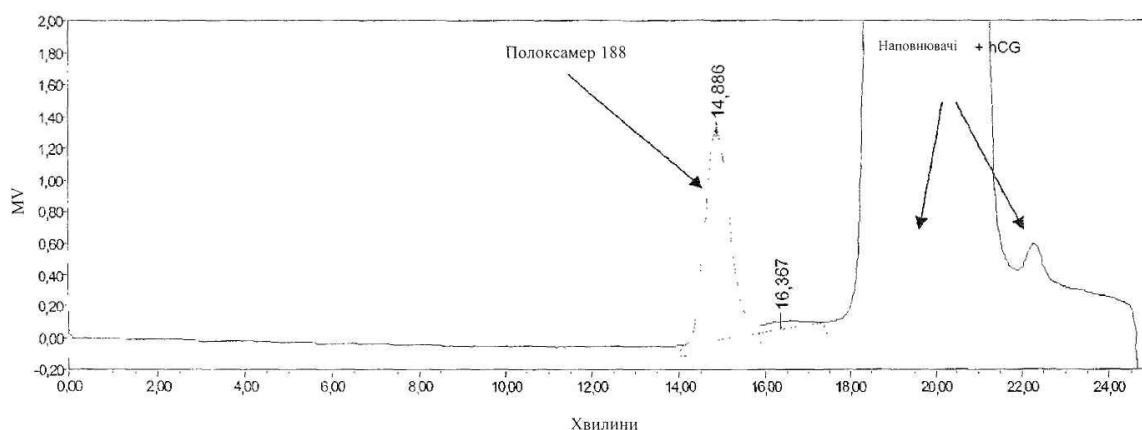
Приклад 3

Мета цього Прикладу полягає в тому, щоб проаналізувати концентрацію Полоксамеру 188 в зразку комерційно доступного рідкого складу hGH Serostim™. Протокол був ідентичний такому в Прикладі 2. Полоксамер міг бути відділений від hGH і кількісно визначений окремо.

Приклад 4

Метою цього Прикладу був аналіз концентрації Полоксамеру 188 в зразку рідкого складу hIFN- β . Протокол був ідентичний такому Прикладу 2.

Полоксамер міг бути відділений від hIFN- β і кількісно визначений окремо.



Фіг. 1