(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 358 330**

(51) Int. CI.:

***A61K 47/10*** (2007.01)
***A61K 38/24*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA TRAS OPOSICIÓN T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2004 PCT/EP2004/050432**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2004 WO04087213**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2004 E 04725385 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **19.09.2018 EP 1610822**

(54) Título: **Formulaciones farmacéuticas líquidas de FSH y LH junto con un tensioactivo no iónico**

(30) Prioridad:

**02.04.2003 EP 03100882**
**27.05.2003 EP 03101543**
**20.06.2003 EP 03101828**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
**03.12.2018**

(73) Titular/es:

**ARES TRADING S.A. (100.0%)**
**Zone Industrielle de l'Ouriettaz**
**1170 Aubonne, CH**

(72) Inventor/es:

**SAMARITANI, FABRIZIO y**
**DONATI, PIERGIORGIO**

(74) Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones farmacéuticas líquidas de FSH y LH junto con un tensioactivo no iónico

### Campo de la invención

La invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas de la hormona estimulante del folículo (abreviada generalmente como FSH por sus iniciales en inglés: follicle-stimulating hormone), formulaciones de la hormona luteinizante, (abreviada generalmente como LH por sus iniciales en inglés: luteinising hormone) y mezclas de FSH y hormona luteinizante (LH), así como a métodos para producir dichas formulaciones.

### Antecedentes de la invención

La hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (CG) son proteínas inyectables que entran dentro de la clase de las gonadotropinas. La FSH, LH y hCG se usan solas y en combinación en el tratamiento de la infertilidad y los trastornos reproductivos en pacientes tanto hembras como machos.

En la naturaleza, la FSH y la LH son producidas por la glándula pituitaria. Para uso farmacéutico, la FSH y la LH y sus variantes se pueden producir por recombinación (rFSH y rLH) o se pueden producir a partir de la orina de mujeres post-menopáusicas (uFSH y uLH).

La FSH se usa en pacientes hembras para inducir la ovulación (OI) y en hiperestimulación ovárica controlada (COH) para técnicas de reproducción asistida (ART). En un régimen de tratamiento típico para la inducción de la ovulación, al paciente se le administran inyecciones diarias de FHS o de un variante (aproximadamente 75 a 300 UI de FSH/día) durante un periodo de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 días. En un régimen de tratamiento típico para la hiperestimulación ovárica controlada, al paciente se le administran inyecciones diarias de FHS o de un variante (aproximadamente 150-600 UI de FSH/día) durante un periodo de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 días.

La FSH también se usa para inducir la espermatogénesis en hombres que padecen oligospermia. Se ha usado con éxito un régimen que usa 150 UI de FSH 3 veces a la semana en combinación con 2.500 UI de hCG dos veces a la semana para obtener una mejora en el recuento del esperma en hombres que padecen hipogonadismo hipogonadotrópico[1].

La LH se usa en pacientes hembras en combinación con la FSH en OI y en COH, particularmente en aquellas pacientes que tienen niveles muy bajos de LH endógena o resistencia a la LH, tales como mujeres que padecen hipogonadismo hipogonadotrópico (HH, Grupo I de la OMS) o pacientes mayores (es decir, de 35 años de edad o mayores) y en pacientes en las que la implantación embrionaria o el aborto temprano plantean problemas. La LH en combinación con la FSH ha estado disponible tradicionalmente en una preparación denominada gonadotropinas menopáusicas humanas (hMG) extraídas de la orina de mujeres post-menopáusicas. LA hMG tiene una relación de actividad FSH:LH de 1:1.

La CG actúa en el mismo receptor que la LH y produce las mismas respuestas. La CG tiene una semivida en la circulación mayor que la LH y por lo tanto se usa generalmente como una fuente de actividad LH de acción prolongada. La CG se usa en regímenes de OI y COH para imitar el pico natural de la LH y activar la ovulación. Una inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) se usa para activar la ovulación al final de la estimulación con FSH o con una mezcla de FSH y LH. La CG también se puede usar junto con la FSH durante la estimulación para la OI y la COH con el fin de proporcionar actividad LH durante la estimulación en pacientes en los que se desea tener actividad LH, tales como los que se han mencionado anteriormente.

La FSH, la LH y la CG son miembros de la familia de las hormonas de glicoproteína, heterodímeros, que también incluye la hormona estimuladora del tiroides (abreviada generalmente como TSH por sus iniciales en inglés: thyroid stimulating hormone). Los miembros de esta familia son heterodímeros que comprenden una subunidad $\alpha$ y una $\beta$. Las subunidades se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes. El heterodímero de la FSH humana (hFSH) consiste en: (i) una subunidad alfa de glicoproteína madura de 92 aminoácidos que también es común en los otros miembros de la familia humana (es decir, la gonadotropina coriónica (CG), la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del tiroides (TSH)); y (ii) una subunidad beta madura de 111 aminoácidos que es característica de la FSH[2]. El heterodímero de LH humana consiste en (i) la subunidad alfa de glicoproteína madura de 92 aminoácidos; y (ii) una subunidad beta madura de 112 aminoácidos que es característica de la LH[3]. Las subunidades alfa y beta de las glicoproteínas pueden tener tendencia a disociarse en las formulaciones debido a la interacción con un conservante, un tensioactivo y otros excipientes. La disociación de las subunidades lleva a la pérdida de potencia biológica[4].

La FSH se formula para inyección intramuscular (IM) o subcutánea (SC). La FSH se suministra en forma liofilizada (sólida) en frascos o ampollas de 75 UI/frasco y 150 UI/frasco con una durabilidad de un año y medio a dos años si se almacena a 2-25ºC. La disolución para la inyección se forma reconstituyendo el producto liofilizado con agua para inyección (API). Para la inducción de la ovulación o la hiperestimulación ovárica controlada, se recomiendan

inyecciones diarias con dosis iniciales de 75 a 600 UI hasta aproximadamente diez días. Dependiendo de la respuesta del paciente, se pueden usar hasta tres ciclos de tratamiento con dosis crecientes de FSH. Con las formulaciones liofilizadas se pide al paciente que reconstituya un frasco de material liofilizado nuevo con diluyente y que se lo administre inmediatamente después de su reconstitución diariamente [Prospecto N1700101A, publicado en febrero de 1996 por Fertinex® (urofolitropina para inyección, purificada) para inyección subcutánea, por Serono Laboratorios, Inc., Randolph, MA].

La FSH también se ha formulado en formatos líquidos bien para dosis única o bien para dosis múltiples, en frascos o ampollas. Los formatos para dosis única deben permanecer estables y potentes durante el almacenamiento antes de su utilización. Los formatos para dosis múltiples no solo deben permanecer estables y potentes durante el almacenamiento antes de su utilización, sino que también deben permanecer estables, potentes y relativamente libres de bacterias durante el periodo de administración en régimen de uso en dosis múltiples, después de que el precinto de la ampolla haya sido roto. Por esta razón, los formatos para dosis múltiples contienen a menudo un agente bacteriostático.

La LH se formula para inyección intramuscular (IM) o subcutánea (SC). La LH se suministra en forma liofilizada (sólida) en frascos o ampollas de 75 UI/frasco con una durabilidad de un año y medio a dos años si se almacena a 2-25ºC. La disolución para inyección se forma reconstituyendo el producto liofilizado con agua para inyección (API). Para la inducción de la ovulación o la hiperestimulación ovárica controlada, junto con la FSH, se recomiendan inyecciones diarias con dosis iniciales de 75 a 600 UI de LH hasta aproximadamente diez días.

El documento EP 0618808 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) describe una composición farmacéutica que comprende una mezcla íntima sólida de gonadotropina y una cantidad estabilizante de sacarosa sola o combinada con glicina.

El documento EP 0814841 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) describe una composición farmacéutica líquida estable que comprende gonadotropina coriónica humana (hCG) recombinante y una cantidad estabilizante de manitol.

El documento EP 0448146 (AZKO N.V.) describe un liofilizado que contiene gonadotropina estabilizada que comprende una parte en peso de gonadotropina; y 200 a 10.000 partes en peso de un estabilizante de una sal de ácido dicarboxílico asociado con la gonadotropina.

El documento EP 0853945 (Akzo Nobel N.V.) describe una formulación líquida que contiene gonadotropina caracterizada porque la formulación comprende una gonadotropina y cantidades estabilizantes de un ácido policarboxílico o una de sus sales y de un compuesto de tioéter.

El documento WO 00/04913 (Eli Lilly and Co.) describe una formulación que comprende FSH o una de sus variantes de la FSH que contiene una subunidad alfa y una beta y un conservante elegido entre el grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquil-parabeno (metil, etil, propil, butil y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o sus mezclas, en un diluyente acuoso.

Todavía persiste la necesidad de formulaciones líquidas estables de FSH o variantes de la FSH, y mezclas de FSH y LH, para administración bien en dosis única o bien en dosis múltiples.

**Compendio de la invención**

Un objetivo de la invención es proporcionar nuevas formulaciones liofilizadas así como líquidas de FSH o variantes de la FSH y LH o variantes de la LH, para proporcionar métodos para su preparación y métodos para su uso farmacéutico o veterinario en el tratamiento de trastornos de la fertilidad.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar nuevas formulaciones liofilizadas y líquidas de mezclas de FSH y LH para proporcionar métodos para su preparación y métodos para su uso farmacéutico o veterinario en el tratamiento de trastornos de la fertilidad.

En un primer aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica liofilizada y líquida que comprende FSH o una de sus variantes y el tensioactivo Pluronic® F68 y comprende además metionina, un agente bacteriostático seleccionado entre fenol y m-cresol, y sacarosa.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para elaborar una composición farmacéutica líquida que comprende formar una disolución de FSH o una de sus variantes, el tensioactivo Pluronic® F68, metionina, un agente bacteriostático seleccionado entre fenol y m-cresol, y sacarosa, y API.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para elaborar una composición farmacéutica envasada que comprende dispensar una disolución que comprende FSH y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina, un agente bacteriostático seleccionado entre fenol y m-cresol, y sacarosa en un frasco.

Además se describe un artículo elaborado para uso farmacéutico humano, que comprende un frasco que comprende

una disolución de FSH o una de sus variantes de la FSH y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina, un agente bacteriostático seleccionado entre fenol y m-cresol, y sacarosa, e información escrita que indica que dicha disolución puede guardarse durante un periodo de justo o aproximadamente veinticuatro horas o más después del primer uso.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica liofilizada y líquida que comprende FSH y LH y el tensioactivo Pluronic® F68 y que comprende además metionina, un agente bacteriostático seleccionado entre fenol y m-cresol, y sacarosa.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para elaborar una composición farmacéutica liofilizada o líquida que comprende formar una disolución de FSH y LH y el tensioactivo Pluronic® F68 metionina, un agente bacteriostático seleccionado entre fenol y m-cresol, y sacarosa.

Además se describe un método para elaborar una composición farmacéutica envasada que comprende dispersar una disolución que comprende FSH y LH y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina, un agente bacteriostático seleccionado entre fenol y m-cresol, y sacarosa, en un frasco.

Además se describe un artículo elaborado para uso farmacéutico humano que comprende un frasco que comprende una disolución de FSH y LH y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina, un agente bacteriostático seleccionado entre fenol y m-cresol, y sacarosa, e información escrita que indica que dicha disolución puede guardarse durante un periodo de justo o aproximadamente veinticuatro horas o más después del primer uso.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un artículo elaborado para uso farmacéutico humano que comprende un primer frasco que comprende FSH liofilizada, o una de sus variantes y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa, y un segundo frasco que comprende un disolvente para la reconstitución, preferiblemente una disolución acuosa que contiene un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol, preferiblemente m-cresol.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un artículo elaborado para uso farmacéutico humano que comprende un primer frasco que comprende LH liofilizada, o una de sus variantes, y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa, y un segundo frasco que comprende un disolvente para la reconstitución, preferiblemente una disolución acuosa que contiene un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol, preferiblemente m-cresol.

En un octavo aspecto, la invención proporciona un artículo elaborado para uso farmacéutico humano que comprende un primer frasco que comprende FSH así como LH o una de sus variantes de la FSH o de la LH, liofilizados y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa, y un segundo frasco que comprende un disolvente para la reconstitución, que es una disolución acuosa con m-cresol o fenol.

**Descripción detallada de la invención**

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra el porcentaje de subunidad $\alpha$ oxidada en las formulaciones de FSH que contienen Pluronic® F68, metionina a 10 $\mu$g/ml ("Met 10 mcg/ml") y 100 $\mu$g/ml ("Met 100 mcg/ml") frente a una formulación sin metionina ("Sin metionina"), para tiempos de 0, 1 semana y 2 semanas.

Las formulaciones líquidas y liofilizadas de FSH o de FSH y LH de la invención tienen propiedades mejoradas y más adecuadas o estabilidad y son útiles para el tratamiento de la infertilidad en mujeres y/u hombres. Estas formulaciones y los artículos elaborados son adecuados adicionalmente para su uso en sistemas de administración inyectables y sistemas alternativos, por ejemplo, pero sin estar limitados a ellos, nasal, pulmonar, oral, subcutáneo, intramuscular o liberación parenteral prolongada. En un modo de realización particularmente preferido, las formulaciones de la invención son para inyección subcutánea y/o intramuscular. Las disoluciones de FSH o variantes de la FSH y de la LH y las formulaciones proporcionadas también pueden tener una potencia *in vivo* aumentada a lo largo del tiempo, en comparación con productos comerciales conocidos, mediante la prevención o la reducción de la pérdida de actividad o de estabilidad, o mediante la mejora de cualquier aspecto de eficacia o de adecuación de la administración, por ejemplo al menos uno entre el modo, frecuencia, dosificación, confort, facilidad de uso, actividad biológica *in vitro* o *in vivo* y similares.

La hormona estimulante del folículo, o FSH, como se usa en la presente memoria, se refiere a la FSH producida como una proteína madura completa que incluye, pero sin limitarse a ella, la FSH humana o "hFSH", bien sea producida por recombinación o bien aislada a partir de fuentes humanas, tales como la orina de mujeres post-menopáusicas. La secuencia proteica de la subunidad alfa de la glicoproteína se da en la SEQ. ID. Nº 1, y la secuencia proteica de la subunidad beta de la FSH humana se da en la SEQ. ID. Nº 2.

La expresión "variante de la FSH" pretende incluir aquellas moléculas que se diferencian de la FSH humana en la secuencia de aminoácidos, el patrón de glicosilación o en una unión dentro de la subunidad, pero que presenta actividad FSH. Los ejemplos incluyen la CTP-FSH, una FSH recombinante modificada de acción prolongada, que consiste en la subunidad de tipo $\alpha$ natural y una subunidad $\beta$ híbrida en la que el péptido carboxi-terminal de la hCG se ha condensado con el C terminal de la subunidad $\beta$ de la FSH, como se describe en LaPolt *et al.*, *Endocrinology*, **1992**, 131, 2514-2520; o en Klein *et al.*, *Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH*

*agonist*; *Human Reprod.* **2003**, 18, 50-56. También se incluye una CTP-FSH de cadena única, una molécula de cadena única, que consiste en las siguientes secuencias (de N terminal a C terminal):

| βFSH | βhCG-CTP (113-145) | αFSH |
|---|---|---|

donde βFSH significa la subunidad β de la FSH, βhCG CTP (113-145) significa el péptido carboxi terminal de la hCG y αFSH significa la subunidad α de la FSH, como se describe en Klein *et al.*[5]. Otros ejemplos de variantes de la FSH incluyen moléculas de FSH que tienen sitios de glicosilación adicionales incorporados en la subunidad α y/o β, como se describe en el documento WO 01/58493 (Maxygen), particularmente como se describe en las reivindicaciones 10 y 11 del documento WO 01/58493, y moléculas de FSH con enlaces S-S dentro de la subunidad, como se describe en el documento WO 98/58957.

Los variantes de la FSH a los que se refiere la presente memoria incluyen las deleciones carboxi-terminales de la subunidad beta que son más cortas que la proteína madura completa de la SEQ. ID. Nº 2. Las deleciones carboxi-terminales de la subunidad beta humana se dan en las SEQ. ID. Nº: 3, 4 y 5. Se entiende que los variantes carboxi-terminales de la cadena beta forman dímeros con una subunidad alfa conocida para formar un heterodímero variante de la FSH.

Los heterodímeros de la FSH o los heterodímeros variantes de la FSH se pueden producir por cualquier método adecuado, tal como por recombinación, por aislamiento o purificación a partir de fuentes naturales como puede ser el caso, o por síntesis química, o mediante cualquier combinación de ellos.

El uso del término “recombinante” se refiere a las preparaciones de la FSH, LH o variantes de la FSH y de la LH que se producen mediante el uso de tecnología de ADN recombinante (véase por ejemplo el documento WO 85/01958). Se conocen las secuencias genómicas y de los clones de ADNc de la FSH para las subunidades alfa y beta de varias especies[6]. Un ejemplo de un método que expresa la FSH o la LH usando tecnología recombinante es mediante la transfección de células eucarióticas con las secuencias de ADN que codifican una subunidad alfa y beta de la FSH o la LH, bien proporcionada sobre un vector o bien sobre dos vectores, teniendo cada subunidad un promotor separado, como se describe en la patentes europeas Nº: EP 0211894 y EP 0487512. Otro ejemplo del uso de la tecnología recombinante para producir FSH o LH es mediante el uso de recombinación homóloga para insertar un segmento regulador heterólogo con conexión operativa en secuencias endógenas que codifican las subunidades de la FSH o de la LH, como se describe en la patente europea EP 0505500 (Applied Research Systems ARS Holding NV).

La FSH o el variante de la FSH usado según la presente invención se puede producir no solo por medios recombinantes, incluyendo a partir de células de mamífero, sino que también se pueden purificar a partir de otras fuentes biológicas, tales como a partir de fuentes urinarias. Las metodologías aceptables incluyen las descritas en Hakola, 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**; y Valove *et al.*, *Endocrinology*, 135 : 2657-2661, **1994**; en la patente de Estados Unidos 3.119.740 y en la patente de Estados Unidos 5.767.067.

La hormona luteinizante, o LH, como se usa en la presente memoria, se refiere a la LH producida como una proteína madura completa, que incluye, pero sin limitarse a ella, la LH humana o “hLH”, ya sea producida por recombinación o bien aislada a partir de fuentes humanas, tales como la orina de mujeres post-menopáusicas. La secuencia proteica de la subunidad alfa de la glicoproteína humana se da en la SEQ. ID. Nº 1, y la secuencia proteica de la subunidad beta de la LH humana[7] se da en la SEQ. ID. Nº 6. En un modo de realización preferido, la LH es recombinante.

La expresión “variante de la LH” pretende incluir aquellas moléculas que se diferencian de la LH humana en la secuencia de aminoácidos, el patrón de glicosilación o en una unión dentro de la subunidad, pero que presenta actividad LH.

Los heterodímeros de la LH o heterodímeros variantes de la LH se pueden producir por cualquier método adecuado, tal como por recombinación, por aislamiento o purificación a partir de fuentes naturales como puede ser el caso o por síntesis química, o cualquier combinación de ellos.

El término “administrar” o “administración” significa introducir una formulación de la presente invención en el cuerpo de un paciente que lo necesita para tratar una enfermedad o trastorno.

El término “paciente” significa un mamífero que es tratado de una enfermedad o trastorno. Los pacientes tienen, pero sin limitarse a ellos, los siguientes orígenes: humano, ovino, porcino, equino, bovino, conejo o similares.

El término “potencia” con respecto a la actividad FSH se refiere a la capacidad de una formulación de FSH o una formulación mixta para producir respuestas biológicas asociadas con la FSH, tal como una ganancia de peso ovárico en el ensayo de Steelman-Pohley[8], o crecimiento folicular en un paciente hembra. El crecimiento folicular en un

paciente hembra puede ser evaluado por ultrasonidos, por ejemplo, en función del número de folículos que tienen un diámetro medio de justo o aproximadamente 16 mm el día 8 de la estimulación. La actividad biológica se evalúa con respecto a un patrón aceptado para la FSH.

El término "potencia" con respecto a la actividad LH se refiere a la capacidad de una formulación de LH o una formulación mixta para producir respuestas biológicas asociadas con la LH, tal como el método de ganancia de peso de la vesícula seminal[9]. La actividad biológica se evalúa con respecto a un patrón aceptado para la LH.

El término "diluyente acuoso" se refiere a un disolvente líquido que contiene agua. Los sistemas disolventes acuosos pueden consistir solo en agua, o pueden consistir en agua más uno o más disolventes miscibles, y pueden contener solutos disueltos, tales como azúcares, tampones, sales u otros excipientes. Los disolventes no acuosos más comúnmente usados son los alcoholes orgánicos de cadena corta, tales como metanol, etanol, propanol, cetonas de cadena corta, tal como la acetona, y polialcoholes, tal como el glicerol.

Un "agente de isotonicidad" es un compuesto que es tolerado fisiológicamente y que confiere una tonicidad adecuada a la formulación para evitar el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación. Para dicho propósito se usan generalmente compuestos tales como glicerina con concentraciones conocidas. Ejemplos de agentes de isotonicidad adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, aminoácidos o proteínas (por ejemplo, glicina o albúmina), sales (por ejemplo, cloruro de sodio) y azúcares (por ejemplo, dextrosa, sacarosa y lactosa), siendo la sacarosa el agente de isotonicidad usado en la presente invención.

El término "bacteriostático" o "agente bacteriostático" se refiere a un compuesto o a composiciones añadidas a la formulación para actuar como agente antibacteriano. Una formulación protegida de la presente invención que contiene FSH o una de sus variantes de la FSH o FSH y LH preferiblemente satisface las directivas legales o reguladoras de la eficacia de los conservantes para ser un producto multiusos comercialmente viable, preferiblemente en humanos. Los ejemplos de agentes bacteriostáticos incluyen fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquil-parabeno (metil, etil, propil, butil y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroaceatato de sodio y timerosal, siendo el fenol y el m-cresol los agentes bacteriostáticos usados en la presente invención.

El término "tampón" o la expresión "tampón fisiológicamente aceptable" se refiere a disoluciones de compuestos que se sabe que son seguras para su uso farmacéutico o veterinario en formulaciones y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación en el intervalo de pH deseado para la formulación. Tampones adecuados para controlar el pH de un pH moderadamente ácido a un pH moderadamente básico incluyen, pero sin estar limitados a ellos, compuestos tales como fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina. "TRIS" se refiere al 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol y a cualquiera de sus sales farmacológicamente aceptables. Los tampones preferidos son los tampones de fosfato con disolución salina o una sal aceptable.

El término "tampón de fosfato" se refiere a disoluciones que contienen ácido fosfórico o sus sales, ajustadas a un pH deseado. Generalmente los tampones de fosfato se preparan a partir de ácido fosfórico o de una sal del ácido fosfórico, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, las sales de sodio y de potasio. En la técnica se conocen varias sales del ácido fosfórico, tales como las sales de sodio y de potasio, monobásicas, dibásicas y tribásicas del ácido. También se sabe que las sales del ácido fosfórico se presentan como hidratos de la sal. Los tampones de fosfato pueden cubrir un intervalo de pH tal como de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10, y los intervalos preferidos son de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9 y un intervalo más preferido de justo o aproximadamente 6,0 hasta justo o aproximadamente 8,0, más preferiblemente a o aproximadamente a pH 7,0.

El término frasco se refiere ampliamente a un recipiente adecuado para conservar la FSH en forma sólida o líquida en un estado estéril contenido. Los ejemplos de un frasco como se usa en la presente memoria, incluyen ampollas, cartuchos, envases en blíster, y otros recipientes similares adecuados para suministrar la FSH al paciente mediante una jeringa, bomba (incluyendo osmótica), catéter, parche transdérmico o pulverización pulmonar o transmucosal. Los frascos adecuados para envasar productos para administración parenteral, pulmonar, transmucosal o transdérmica son bien conocidos y reconocidos en la técnica.

El término "estabilidad" se refiere a la estabilidad física, química y conformacional de la FSH y la LH en las formulaciones de la presente invención (incluyendo el mantenimiento de la potencia biológica). La inestabilidad de una formulación de proteína puede ser producida por degradación química o agregación de las moléculas de proteína para formar polímeros de orden superior, por disociación de los heterodímeros en monómeros, desglicosilación, modificación de la glicosilación, oxidación (particularmente de la subunidad $\alpha$) o cualquier otra modificación estructural que reduzca al menos una actividad biológica de un polipéptido de la FSH incluido en la presente invención.

Una disolución o formulación "estable" es una en la que el grado de degradación, modificación, agregación, pérdida de la actividad biológica y similares, de las proteínas en ella está controlada aceptablemente y no aumenta de forma inaceptable a lo largo del tiempo. Preferiblemente, la formulación mantiene al menos hasta o aproximadamente hasta el 80% de la actividad de la FSH indicada en la etiqueta y al menos hasta o aproximadamente hasta el 80% de la actividad de la LH indicada en la etiqueta, durante un periodo de 6 meses a una temperatura de justo o

aproximadamente 2-8ºC, más preferiblemente de justo o aproximadamente 2-8ºC, más preferiblemente de justo o aproximadamente 4-5ºC. La actividad de la FSH se puede medir usando el bioensayo de ganancia de peso ovárico de Steelman-Pohley[5]. La actividad de la LH se puede medir usando el bioensayo de ganancia de peso de la vesícula seminal[10].

El término "tratamiento" se refiere a la administración, seguimiento, control y/o cuidado de un paciente para el que la administración de FSH y/o LH es adecuada con el propósito de la estimulación del folículo o testicular o cualquier otra respuesta fisiológica regulada por la FSH y/o la LH. El tratamiento puede incluir, por lo tanto, pero sin limitarse a ello, la administración de FSH y/o LH para la inducción o la mejora de la calidad del esperma, la estimulación de la liberación de testosterona en los machos o el desarrollo folicular o la inducción de la ovulación en las hembras.

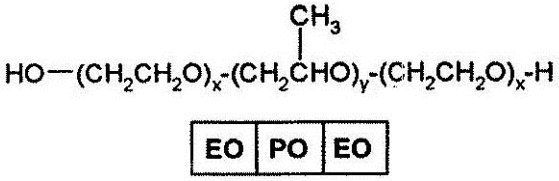
La expresión "uso en dosis múltiples" pretende incluir el uso de un único frasco, ampolla o cartucho de una formulación de FSH o una formulación de FSH y LH para más de una inyección, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 ó más inyecciones. Las inyecciones se hacen preferiblemente durante un periodo de al menos o de aproximadamente 12 horas, 24 horas, 48 horas, etc., preferiblemente hasta un periodo de justo o aproximadamente 12 días. Las inyecciones pueden espaciarse en el tiempo, por ejemplo, durante un periodo de 6, 12, 24, 48 ó 72 horas.

Una "sal" de una proteína es una sal de adición de ácido o de base. Dichas sales se forman preferiblemente entre uno cualquiera o más de los grupos cargados en la proteína y cualquier o más cationes o aniones no tóxicos fisiológicamente aceptables. Las sales orgánicas e inorgánicas incluyen, por ejemplo, las preparadas a partir de ácidos tales como el clorhídrico, sulfúrico, sulfónico, tartárico, fumárico, bromhídrico, gliclólico, cítrico, maleico, fosfórico, succínico, acético, nítrico, benzoico, ascórbico, p-toluenosulfónico, bencenosulfónico, naftalenosulfónico, propiónico, carbónico y similares, o, por ejemplo, amonio, sodio, potasio, calcio o magnesio.

Los inventores han encontrado que formulando la FSH y las mezclas de FSH y LH con el tensioactivo Pluronic® F68 (BASF, Pluronic® F68 también se conoce como Poloxámero 188), se obtienen formulaciones estables que minimizan la pérdida de principio activo (FSH o FSH y LH) producida por adsorción sobre las superficies del frasco y/o del dispositivo de administración (por ejemplo, jeringa, bomba, catéter, etc.).

Los inventores han encontrado además que formulando la FSH y mezclas de FSH y LH con el tensioactivo Pluronic® F68 (BASF, Pluronic® F68 también se conoce como Poloxámero 188), se obtiene una formulación estable que evita el problema de precipitación en presencia de un agente bacteriostático, tal como m-cresol y fenol. La precipitación, que produce la formación de disoluciones turbias o lechosas, se produce cuando se usa TWEEN 20 con m-cresol o fenol.

Los tensioactivos Pluronic® son copolímeros de bloques de óxido de etileno (EO, por sus iniciales en inglés) y óxido de propileno (PO, por sus iniciales en inglés). El bloque de óxido de propileno (PO) está encajado entre dos bloques de óxido de etileno (EO).




Los tensioactivos Pluronic® se sintetizan mediante un procedimiento en dos etapas:

1. Se crea un hidrófobo del peso molecular deseado mediante la adición controlada de óxido de propileno a los dos grupos hidroxilo del propilenglicol; y

2. Se añade óxido de etileno para intercalar el hidrófobo entre los grupos hidrofílicos. En el Pluronic® F77, el porcentaje de polioxietileno (hidrófilo) es de 70% y el peso molecular del hidrófobo (polioxipropileno) es de aproximadamente 2.306 Da.

En el Pluronic® F87, el porcentaje de polioxietileno (hidrófilo) es de 70% y el peso molecular del hidrófobo (polioxipropileno) es de aproximadamente 2.644 Da.

En el Pluronic® F88, el porcentaje de polioxietileno (hidrófilo) es de 80% y el peso molecular del hidrófobo (polioxipropileno) es de aproximadamente 2.644 Da.

En el Pluronic® F68, el porcentaje de polioxietileno (hidrófilo) es de 80% y el peso molecular del hidrófobo (polioxipropileno) es de aproximadamente 1.967 Da.

Las propiedades típicas del Pluronic® F77 se indican a continuación:

Peso molecular medio: 6.600;

Punto de fusión/punto de fluidez crítica: 48ºC;

Forma física a 20ºC: sólido;

Viscosidad (Brookfield) cps: 480 [líquido a 25ºC, pasta a 60ºC y sólido a 77ºC];

Tensión superficial, dinas/cm a 25ºC:

Concentración al 0,1%: 47,0

Concentración al 0,01%: 49,3

Concentración al 0,001%: 52,8

Tensión interfacial, dinas/cm a 25ºC frente al Nujol:

Concentración al 0,1%: 17,7

Concentración al 0,01%: 20,8

Concentración al 0,001%: 25,5

Humectación Draves, segundos a 25ºC:

Concentración al 1,0%: > 360

Concentración al 0,1%: > 360

Altura de espuma:

Ross Miles, 0,1%, mm a 50ºC: 100

Ross Miles, 0,1%, mm a 26ºC: 47

Dinámica, 0,1%, mm a 400 ml/min: > 600

Punto de turbidez en disolución acuosa, ºC:

Concentración al 1%: > 100

Concentración al 10%: > 100

HLB (equilibrio hidrófilo-lipófilo): 25

Las propiedades típicas del Pluronic® F87 se indican a continuación:

Peso molecular medio: 7.700;

Punto de fusión/punto de fluidez crítica: 49ºC;

Forma física a 20ºC: sólido;

Viscosidad (Brookfield) cps: 700 [líquido a 25ºC, pasta a 60ºC y sólido a 77ºC];

Tensión superficial, dinas/cm (mN/m)a 25ºC:

Concentración al 0,1%: 44,0

Concentración al 0,01%: 47,0

Concentración al 0,001%: 50,2

Tensión interfacial, dinas/cm a 25ºC frente al Nujol:

Concentración al 0,1%: 17,4

Concentración al 0,01%: 20,3

Concentración al 0,001%: 23,3

Humectación Draves, segundos a 25ºC:

Concentración al 1,0%: > 360

Concentración al 0,1%: > 360

Altura de espuma:

Ross Miles, 0,1%, mm a 50ºC: 80

Ross Miles, 0,1%, mm a 26ºC: 37

Dinámica, 0,1%, mm a 400 ml/min: > 600

Punto de turbidez en disolución acuosa, ºC:

Concentración al 1%: > 100

Concentración al 10%: > 100

HLB (equilibrio hidrófilo-lipófilo): 24

Las propiedades típicas del Pluronic® F88 se indican a continuación:

Peso molecular medio: 11.400;

Punto de fusión/punto de fluidez crítica: 54ºC;

Forma física a 20ºC: sólido;

Viscosidad (Brookfield) cps: 2.300 [líquido a 25ºC, pasta a 60ºC y sólido a 77ºC];

Tensión superficial, dinas/cm a 25ºC:

Concentración al 0,1%: 48,5

Concentración al 0,01%: 52,6

Concentración al 0,001%: 55,7

Tensión interfacial, dinas/cm a 25ºC frente al Nujol:

Concentración al 0,1%: 20,5

Concentración al 0,01%: 23,3

Concentración al 0,001%: 27,0

Humectación Draves, segundos a 25ºC:

Concentración al 1,0%: > 360

Concentración al 0,1%: > 360

Altura de espuma:

Ross Miles, 0,1%, mm a 50ºC: 80

Ross Miles, 0,1%, mm a 26ºC: 37

Dinámica, 0,1%, mm a 400 ml/min: > 600

Punto de turbidez en disolución acuosa, ºC:

Concentración al 1%: > 100

Concentración al 10%: > 100

HLB (equilibrio hidrófilo-lipófilo): 28

Las propiedades típicas del Pluronic® F68 se indican a continuación:

Peso molecular medio: 8.400;

Punto de fusión/punto de fluidez crítica: 52ºC;

Forma física a 20ºC: sólido;

Viscosidad (Brookfield) cps: 1000 [líquido a 25ºC, pasta a 60ºC y sólido a 77ºC];

Tensión superficial, dinas/cm a 25ºC:

Concentración al 0,1%: 50,3

Concentración al 0,01%: 51,2

Concentración al 0,001%: 53,6

Tensión interfacial, dinas/cm a 25ºC frente al Nujol:

Concentración al 0,1%: 19,8

Concentración al 0,01%: 24,0

Concentración al 0,001%: 26,0

Humectación Draves, segundos a 25ºC:

Concentración al 1,0%: > 360

Concentración al 0,1%: > 360

Altura de espuma:

Ross Miles, 0,1%, mm a 50ºC: 35

Ross Miles, 0,1%, mm a 26ºC: 40

Dinámica, 0,1%, mm a 400 ml/min: > 600

Punto de turbidez en disolución acuosa, ºC:

Concentración al 1%: > 100

Concentración al 10%: > 100

HLB (equilibrio hidrófilo-lipófilo): 29

El tensioactivo preferido es el Pluronic® F68.

El Pluronic® F68 está presente preferiblemente en la formulación a una concentración que es suficiente para mantener la estabilidad de la FSH y/o de la LH a lo largo del periodo de almacenamiento deseado (por ejemplo, de 6 a 12 a 24 meses) y también a una concentración que es suficiente para evitar las pérdidas de proteína debidas a adsorción sobre las superficies, tales como las del frasco, ampolla o cartucho o de la jeringa.

Preferiblemente, la concentración de Pluronic® F68, en formulaciones líquidas, es de justo o aproximadamente 0,01 mg/ml hasta justo o aproximadamente 1 mg/ml, más preferiblemente de justo o aproximadamente 0,05 mg/ml hasta justo o aproximadamente 0,5 mg/ml, más particularmente preferido de justo o aproximadamente 0,2 mg/ml hasta justo o aproximadamente 0,4 mg/ml, lo más preferiblemente de o aproximadamente de 0,1 mg/ml.

La hormona estimulante del folículo (FSH) en formulación liofilizada está presente preferiblemente a una concentración (peso/peso) de justo o aproximadamente 0,1 a 10 μg/mg de la formulación total. En un modo de realización, la hormona estimulante del folículo (FSH) está presente a una concentración de justo o aproximadamente 0,3 a 5 μg/mg de la formulación total. En un modo de realización adicional, la hormona estimulante del folículo (FSH) está presente a una concentración de justo o aproximadamente 0,37 a 2 μg/mg de la formulación total.

La hormona luteinizante (LH) en formulación liofilizada está presente preferiblemente a una concentración de justo o aproximadamente 0,1 a 3 μg/mg de la formulación total. En un modo de realización, la hormona luteinizante (LH) está presente a una concentración de justo o aproximadamente 0,1 a 1 μg/mg de la formulación total. En un modo de realización adicional, la hormona luteinizante (LH) está presente a una concentración de justo o

aproximadamente 0,1 a 0,6 μg/mg de la formulación total.

En las formulaciones líquidas –incluyendo las formulaciones reconstituidas- que comprenden FSH, preferiblemente la concentración de FSH en la formulación es de justo o aproximadamente 150 UI/ml hasta justo o aproximadamente 2.000 UI/ml, más preferiblemente de justo o aproximadamente 300 UI/ml hasta justo o aproximadamente 1.500 UI/ml, más particularmente preferible de justo o aproximadamente 450 hasta justo o aproximadamente 750, lo más preferiblemente de justo o aproximadamente 600 UI/ml.

En las formulaciones líquidas –incluyendo las formulaciones reconstituidas- que comprenden LH, preferiblemente la concentración de LH en la formulación es de justo o aproximadamente 50 UI/ml hasta justo o aproximadamente 2.000 UI/ml, más preferiblemente de justo o aproximadamente 150 UI/ml hasta justo o aproximadamente 1.500 UI/ml, más particularmente preferible de justo o aproximadamente 300 hasta justo o aproximadamente 750 UI/ml, particularmente preferible de justo o aproximadamente 625 UI/ml.

En las formulaciones que comprenden tanto FSH como LH, la relación entre la FSH y la LH (FSH:LH, UI:UI, FSH medida mediante el ensayo de ganancia de peso ovárico en ratas y LH medida mediante el ensayo de ganancia de peso de la vesícula seminal en ratas) está preferiblemente en el intervalo de justo o aproximadamente 6:1 hasta justo o aproximadamente 1:6, más preferiblemente de justo o aproximadamente 4:1 hasta justo o aproximadamente 1:2, más particularmente preferido de justo o aproximadamente 3:1 hasta justo o aproximadamente 1:1. Las relaciones particularmente preferidas son 1:1 y 2:1.

En las formulaciones liofilizadas, el tensioactivo Pluronic® F68 está preferiblemente presente a una concentración de justo o aproximadamente 0,001 hasta justo o aproximadamente 0,1 mg por mg de la formulación total, más preferiblemente de justo o aproximadamente 0,01 hasta justo o aproximadamente 0,075 mg/mg.

Preferiblemente, la concentración de Pluronic® F68 en las formulaciones reconstituidas es de justo o aproximadamente 0,01 mg/ml hasta justo o aproximadamente 1 mg/ml, más preferiblemente de justo o aproximadamente 0,05 mg/ml hasta justo o aproximadamente 0,5 mg/ml, más particularmente preferido de justo o aproximadamente 0,2 mg/ml hasta justo o aproximadamente 0,4 mg/ml, lo más preferiblemente de justo o aproximadamente 0,1 mg/ml.

Preferiblemente, la FSH y la LH se producen por recombinación, de forma particularmente preferida se producen en células de ovario de hámster chino transfectadas con un vector o vectores que comprenden ADN que codifica para la subunidad alfa y la subunidad beta de glicoproteína humana de la FSH o la LH. El ADN que codifica para las subunidades alfa y beta puede estar presente en el mismo o en diferentes vectores.

La FSH y la LH recombinantes presentan varias ventajas frente a sus homólogas urinarias. Las técnicas de cultivo y aislamiento que usan células recombinantes permiten obtener lotes consistentes. Por el contrario, la FSH y la LH de origen urinario varían de forma importante de un lote a otro en características tales como pureza, patrón de glicosilación y sialilación y oxidación de las subunidades. Debido a la mayor consistencia entre lotes y pureza de la FSH y LH recombinantes, las hormonas pueden ser identificadas y cuantificadas fácilmente usando técnicas tales como focalización isoeléctrica (IEF, por sus iniciales en inglés). La facilidad con la que se pueden identificar y cuantificar la FSH y LH recombinantes permite llenar los frascos por masa de la hormona (dosificación en masa) en lugar de llenarlos por bioensayo.

Preferiblemente, las formulaciones de FSH de la presente invención tienen un pH de justo o aproximadamente 6,0 hasta justo o aproximadamente 8,0, más preferiblemente de justo o aproximadamente 6,8 hasta justo o aproximadamente 7,8, incluyendo un pH de aproximadamente 7,0, 7,2 y 7,4. Un tampón preferido es el de fosfato, siendo los contraiones preferidos los iones de sodio o potasio. Los tampones de fosfato con disolución salina son bien conocidos en la técnica, tal como la disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco. Las concentraciones de tampón en la disolución total pueden variar de justo o aproximadamente 5mM, 9,5mM, 10mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM y 500mM. Preferiblemente, la concentración de la disolución tampón es de justo o aproximadamente 10mM. Se prefiere particularmente una disolución tampón 10mM en iones fosfato con un pH de 7,0.

Preferiblemente, las formulaciones o mezclas de FSH y LH de la presente invención tienen un pH de justo o aproximadamente 6,0 hasta justo o aproximadamente 9,0, más preferiblemente de justo o aproximadamente 6,8 hasta justo o aproximadamente 8,5, incluyendo un pH de aproximadamente 7,0, 8,0 y 8,2, lo más preferiblemente un pH de justo o aproximadamente 8,0.

La invención se refiere a formulaciones líquidas así como a formulaciones secadas por congelación (liofilizadas) que pueden ser reconstituidas, en las que el disolvente (también para la reconstitución) es agua para inyección. Las formulaciones líquidas pueden ser para una dosis única o para múltiples dosis. Las formulaciones líquidas así como las secadas por congelación de FSH y/o de LH de la invención que se pretende que sean para su uso en múltiples dosis comprenden un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol. El más preferido es el m-cresol. El agente bacteriostático se usa en una cantidad que dé una concentración que sea eficaz para mantener la formulación esencialmente libre de bacterias (adecuada para inyección) durante el periodo de inyección de las múltiples dosis, que puede ser de justo o aproximadamente 12 ó 24 horas hasta justo o aproximadamente 12 ó 14

días, preferiblemente de justo o aproximadamente 6 hasta justo o aproximadamente 12 días. El agente bacteriostático está presente preferiblemente en una concentración de justo o aproximadamente 0,1% (masa del agente bacteriostático/masa del disolvente) hasta justo o aproximadamente 2,0%, más preferiblemente de justo o aproximadamente 0,2% hasta justo o aproximadamente 1,0%. En el caso del fenol, se prefiere particularmente de justo o aproximadamente 0,5%. En el caso del m-cresol, la concentración particularmente preferida es de justo o aproximadamente 0,3% (por ejemplo, de justo o aproximadamente 3 mg/ml de API).

En un modo de realización preferido, la invención proporciona una composición farmacéutica líquida, preferiblemente para uso en múltiples dosis, que comprende FSH o una de sus variantes, el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol.

En un modo de realización preferido adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica líquida, preferiblemente para uso en múltiples dosis, que comprende LH, el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol.

En todavía un modo de realización preferido adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica líquida, preferiblemente para uso en múltiples dosis, que comprende FSH y LH, el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol.

Preferiblemente, la FSH y la LH están presentes en una relación (FSH:LH) de justo o aproximadamente 2:1 hasta justo o aproximadamente 1:1.

En un modo de realización preferido adicional, la invención proporciona un método para elaborar una composición farmacéutica líquida, preferiblemente para uso en múltiples dosis, que comprende elaborar una disolución acuosa de FSH o una de sus variantes, el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol, y API.

En un modo de realización preferido adicional, la invención proporciona un método para elaborar una composición farmacéutica líquida, preferiblemente para uso en múltiples dosis, que comprende elaborar una disolución acuosa de LH, el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol, y API.

En un modo de realización preferido adicional, la invención proporciona un método para elaborar una composición farmacéutica líquida, preferiblemente para uso en múltiples dosis, que comprende elaborar una disolución acuosa de FSH y LH, el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol, y API.

En todavía otro modo de realización preferido, la invención proporciona un método para elaborar una composición farmacéutica envasada que comprende administrar una disolución que comprende FSH, el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol.

En todavía otro modo de realización preferido, la invención proporciona un método para elaborar una composición farmacéutica envasada que comprende administrar una disolución que comprende FSH y LH, el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol.

En todavía otro modo de realización preferido, la invención proporciona un artículo elaborado para uso farmacéutico en humanos que comprende un frasco que comprende una disolución de FSH o una de sus variantes de la FSH, el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol, y material escrito que indica que dicha disolución puede guardarse durante un periodo de justo o aproximadamente veinticuatro horas o más después del primer uso. Preferiblemente, el material escrito indica que la disolución puede guardarse

En todavía otro modo de realización preferido, la invención proporciona un artículo elaborado para uso farmacéutico en humanos que comprende un frasco que comprende una disolución de FSH y LH, el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol, e información escrita que indica que dicha disolución puede guardarse durante un periodo de justo o aproximadamente veinticuatro horas o más después del primer uso. Preferiblemente, el material escrito indica que la disolución puede guardarse hasta justo o aproximadamente 12 ó 14 días después del primer uso.

En un modo de realización particularmente preferido, la formulación comprende m-cresol y Pluronic® F68. Los inventores han encontrado sorprendentemente que las formulaciones que comprenden Pluronic® F68 no precipitan en presencia de m-cresol, un problema observado con otros tensioactivos.

Antes de su primer uso, es decir antes de que el precinto del frasco, ampolla o cartucho haya sido roto, las formulaciones de la invención pueden guardarse durante al menos justo o aproximadamente 6 meses, 12 meses o 24 meses. En las condiciones de almacenamiento preferidas, antes de su primer uso, las formulaciones se mantienen protegidas de la luz brillante (preferiblemente en la oscuridad) y a temperaturas de justo o

aproximadamente 2-8ºC, más preferiblemente de justo o aproximadamente 4-5ºC.

En un modo de realización específico, la invención proporciona una formulación liofilizada para reconstitución, preferiblemente para uso en múltiples dosis, que comprende FSH o una de sus variantes y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa.

En un modo de realización específico adicional, la invención proporciona una formulación liofilizada para reconstitución, preferiblemente para uso en múltiples dosis, que comprende LH y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa.

En un modo de realización específico adicional, la invención proporciona una formulación liofilizada, preferiblemente para uso en múltiples dosis, que comprende FSH y LH y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa.

Preferiblemente, la FSH y la LH están presentes en una relación (FSH:LH) de justo o aproximadamente 2:1 hasta justo o aproximadamente 1:1.

En un modo de realización específico adicional, la invención proporciona un método para elaborar una formulación liofilizada, preferiblemente para uso en múltiples dosis después de su reconstitución, que comprende formar una mezcla de FSH o de una de sus variantes con el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y someter dicha mezcla a liofilización.

En un modo de realización específico adicional, la invención proporciona un método para elaborar una formulación liofilizada, preferiblemente para uso en múltiples dosis después de su reconstitución, que comprende formar una mezcla de LH con el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa y someter dicha mezcla a liofilización.

En un modo de realización específico adicional, la invención proporciona un método para elaborar una formulación liofilizada, preferiblemente para uso en múltiples dosis después de su reconstitución, que comprende formar una mezcla de FSH y LH, así como el tensioactivo Pluronic® F68 y someter dicha mezcla a liofilización.

En todavía otro modo de realización preferido, la invención proporciona un método para elaborar una composición farmacéutica envasada que comprende administrar una mezcla liofilizada que comprende FSH y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa.

En todavía otro modo de realización preferido, la invención proporciona un método para elaborar una composición farmacéutica envasada que comprende administrar una mezcla liofilizada que comprende LH y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa en un frasco.

En todavía otro modo de realización preferido, la invención proporciona un método para elaborar una composición farmacéutica envasada que comprende administrar una mezcla liofilizada que comprende FSH así como LH y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa en un frasco.

En todavía otro modo de realización preferido, la invención proporciona un artículo elaborado para uso farmacéutico en humanos que comprende un primer frasco o frasco que contiene FSH o una de sus variantes de la FSH liofilizados y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa. Un segundo frasco o frasco contiene un diluyente para reconstitución, preferiblemente agua y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol.

En todavía otro modo de realización preferido, la invención proporciona un artículo elaborado para uso farmacéutico en humanos que comprende un primer frasco o frasco que contiene LH o una de sus variantes de la LH liofilizados y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa. Un segundo frasco o frasco contiene un diluyente para reconstitución, preferiblemente agua y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol.

En todavía otro modo de realización preferido, la invención proporciona un artículo elaborado para uso farmacéutico en humanos que comprende un primer frasco o frasco que contiene FSH o una de sus variantes de la FSH así como LH o una de sus variantes de la LH liofilizados y el tensioactivo Pluronic® F68, metionina y sacarosa. Un segundo frasco o frasco contiene un diluyente para reconstitución, preferiblemente agua y un agente bacteriostático elegido entre m-cresol y fenol, preferiblemente m-cresol.

En un modo de realización particularmente preferido, el disolvente para reconstitución comprende m-cresol. Los inventores han encontrado que las formulaciones liofilizadas que comprenden Pluronic® F68, metionina y sacarosa no precipitan cuando se reconstituyen con un diluyente que contiene m-cresol, un problema observado con otros tensioactivos, por ejemplo Tween.

Las formulaciones liofilizadas de la invención se pueden mantener al menos durante justo o aproximadamente 6 meses, 12 meses o 24 meses. En las condiciones de almacenamiento preferidas, antes de su primer uso, las formulaciones se mantienen protegidas de la luz brillante (preferiblemente en la oscuridad) y a temperaturas de justo o aproximadamente 2-8ºC, más preferiblemente de justo o aproximadamente 4-5ºC.

Después del primer uso de una formulación líquida o reconstituida para múltiples dosis, esta se puede mantener y usar durante al menos 24 horas, preferiblemente al menos durante justo o aproximadamente 4, 5 ó 6 días, más preferiblemente durante hasta 12 ó 14 días. Después del primer uso, la formulación se almacena preferiblemente a una temperatura por debajo de la temperatura ambiente (es decir, por debajo de aproximadamente 25ºC), más preferiblemente por debajo de justo o aproximadamente 10ºC, más preferiblemente justo o aproximadamente a 2-8ºC, lo más preferiblemente justo o aproximadamente a 5-0ºC.

Las formulaciones de la invención contienen el antioxidante metionina. El antioxidante evita la oxidación de la FSH y de la LH (particularmente de la subunidad $\alpha$).

La metionina en las formulaciones líquidas y/o reconstituidas está presente preferiblemente a un concentración de justo o aproximadamente 0,01 hasta exacta o aproximadamente 1,0 mg/ml, más preferiblemente de justo o aproximadamente 0,05 hasta exacta o aproximadamente 0,5 mg/ml, lo más preferiblemente de justo o aproximadamente 0,1 mg/ml.

Las formulaciones de la invención contienen sacarosa, preferiblemente a una concentración de justo o aproximadamente 60 mg/ml.

Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona formulaciones líquidas para un solo uso y para uso en múltiples dosis que contienen un agente bacteriostático o a las que se añade un agente bacteriostático cuando se reconstituye la formulación. Las formulaciones de la invención son adecuadas para uso farmacéutico o veterinario.

Como se ha indicado anteriormente, en un modo de realización preferido la invención proporciona un artículo elaborado que comprende material envasado y un frasco que comprende una disolución de FSH o una variante de la FSH, LH, o FSH y LH, Pluronic® F68, metionina, sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol, opcionalmente con tampones y/u otros excipientes, en un diluyente acuoso, en el que dicho material envasado comprende material escrito que indica que dicha disolución se puede mantener durante un periodo de veinticuatro horas o más después del primer uso. La invención comprende además un artículo elaborado que comprende material envasado, un frasco que comprende una formulación de FSH o de un variante de la FSH según la invención, en el que dicho material envasado comprende material escrito que instruye al paciente sobre como reconstituir la FSH o una de sus variantes de la FSH en el diluyente acuoso para formar una disolución que se puede mantener durante un periodo de veinticuatro horas o más.

Como se ha indicado anteriormente, en un modo de realización preferido la invención proporciona un artículo elaborado que comprende un material envasado y un frasco que comprende FSH o una de sus variantes de la FSH, LH o una de sus variantes de la LH, o FSH y LH liofilizados, Pluronic® F68, metionina y sacarosa. El agente bacteriostático en el segundo frasco que incluye el diluyente se elige entre fenol y m-cresol, opcionalmente con excipientes adicionales, donde dicho material envasado comprende material escrito que indica que dicha disolución puede guardarse durante un periodo de veinticuatro horas o más después de su primer uso.

El intervalo de hormona proteica en las formulaciones de la invención incluye cantidades que dan, después de la reconstitución, concentraciones de aproximadamente 1,0 $\mu$g/ml a aproximadamente 50 mg/ml, aunque se puede operar con concentraciones mayores y menores y dependen del vehículo de administración previsto, por ejemplo las formulaciones en disolución se diferenciarán de los parches transdérmicos y de las de administración pulmonar, transmucosal o por métodos osmóticos o por microbombas. La concentración de la hormona proteica es preferiblemente de justo o aproximadamente 5,0 $\mu$g/ml a justo o aproximadamente 2 mg/ml, más preferiblemente de justo o aproximadamente 10 $\mu$g/ml a justo o aproximadamente 1 mg/ml, lo más preferiblemente de justo o aproximadamente 50 $\mu$g/ml a justo o aproximadamente 200 $\mu$g/ml.

El intervalo de hormona proteica en las formulaciones de la invención incluye cantidades que dan, después de la reconstitución, concentraciones de aproximadamente 1,0 $\mu$g/ml a aproximadamente 50 mg/ml, aunque se puede operar con concentraciones mayores y menores y dependen del vehículo de administración previsto, por ejemplo las formulaciones en disolución se diferenciarán de los parches transdérmicos y de las de administración pulmonar, transmucosal o por métodos osmóticos o por microbombas. La concentración de la hormona proteica es preferiblemente de justo o aproximadamente 5,0 $\mu$g/ml a justo o aproximadamente 2 mg/ml, más preferiblemente de justo o aproximadamente 10 $\mu$g/ml a justo o aproximadamente 1 mg/ml, lo más preferiblemente de justo o aproximadamente 50 $\mu$g/ml a justo o aproximadamente 200 $\mu$g/ml.

Preferiblemente, las formulaciones de la invención retienen al menos justo o aproximadamente 80% de la actividad de la FSH y/o de la actividad de la LH en el tiempo de envasado durante un periodo de 24 meses (antes de su primer uso). La actividad de la FSH se puede medir usando el bioensayo de Steelman-Pohley de ganancia de peso ovárico[5]. La actividad de la LH se puede medir mediante el bioensayo de ganancia de peso de la vesícula seminal en ratas.

Las formulaciones líquidas de la presente invención se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende mezclar la FSH o una de sus variantes de la FSH, la LH, o una mezcla de FSH y LH y el Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre el fenol y el m-cresol como sólidos o disolver la FSH o una de

sus variantes de la FSH, la LH, o una mezcla de FSH y LH ("proteína") y el Pluronic® F68 y un agente bacteriostático elegido entre el fenol y el m-cresol en un diluyente acuoso. La mezcla de los componentes y su disolución en un diluyente acuoso se realiza usando procedimientos convencionales de disolución y mezcla. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, una cantidad medida de FSH o de un variante de la FSH, LH o una mezcla de FSH y LH en una disolución tamponada se combina con Pluronic® F68, metionina y sacarosa y un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol en una disolución tamponada en cantidades suficientes para proporcionar la proteína, el Pluronic® F68 y el agente bacteriostático en las concentraciones deseadas. La disolución resultante se suministra entonces en frascos, ampollas o cartuchos. Las variaciones de este procedimiento serán reconocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el orden en el que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la formulación, son todos factores que pueden ser optimizados para la concentración y los medios de administración usados.

En un modo de realización preferido, las formulaciones líquidas de la invención se elaboran preparando disoluciones madre individuales de concentración conocida de todos los componentes de la formulación (por ejemplo, disolución tampón de fosfato de sodio, sacarosa, metionina, FSH y/o LH), y tomando cantidades volumétricas alícuotas para formar una "disolución madre" de la misma composición que la formulación final. La "disolución madre" se filtra preferiblemente a través de una membrana Duropore® (Millipore) 0,22 micrones PDF para eliminar los micro-organismos y a continuación las alícuotas se administran en frascos individuales, tal como frascos, ampollas o cartuchos.

Las formulaciones liofilizadas de la presente invención se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende mezclar la FSH o una de sus variantes de la FSH, la LH o una de sus variantes de la LH, o una mezcla de FSH y LH, y Pluronic® F68, metionina y sacarosa, así como otros excipientes de tipo tampón y someter la mezcla a liofilización. La mezcla de los componentes y su liofilización se realizan usando procedimientos convencionales. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, se combina una cantidad medida de FSH o una de sus variantes de la FSH, LH o una de sus variantes de la LH o una mezcla de FSH y LH, con Pluronic® F68, metionina y sacarosa y la mezcla resultante se liofiliza y a continuación se suministra en frascos, ampollas o cartuchos. Las variaciones de este procedimiento serán reconocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el orden en el que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la formulación, son todos factores que pueden ser optimizados para la concentración y los medios de administración usados.

Las formulaciones de la invención se pueden administrar usando dispositivos reconocidos. Los ejemplos que comprenden estos sistemas de frasco único incluyen dispositivos de lápiz-inyector para administrar una disolución tal como EasyJect®, Gonal-F® Pen, Humaject®, NovoPen®, B-D® Pen, AutoPen® y Optipen®.

Los productos reivindicados en la presente memoria incluyen material envasado. El material envasado proporciona, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones en las que se debe usar el producto. El material envasado de la presente invención proporciona instrucciones a los pacientes para reconstituir la FSH o una de sus variantes de la FSH en el diluyente acuoso para formar una disolución y para usar la disolución durante un periodo de veinticuatro horas o más para el producto en dos frascos de producto húmedo/seco. Para el producto en disolución en un solo frasco, la etiqueta indica que dicha disolución puede ser almacenada después de su primer uso por un periodo de veinticuatro horas o más, preferiblemente hasta 12 ó 14 días. Los productos reivindicados en la presente memoria son útiles para su uso como producto farmacéutico en humanos.

Las formulaciones estables conservadas pueden ser administradas a los pacientes como disoluciones límpidas. La disolución puede ser para un solo uso o puede ser reutilizada varias veces y puede ser suficiente para un solo ciclo o varios ciclos del tratamiento del paciente y, por lo tanto, proporciona un régimen de tratamiento más conveniente que el que está disponible actualmente.

La FSH o una de sus variantes de la FSH, la LH o las mezclas de FSH y LH en las formulaciones o disoluciones, tanto estables como conservadas, descritas en la presente memoria, pueden ser administradas a un paciente según la presente invención mediante varios métodos de administración, incluyendo inyección SC o IM; administración transdérmica, pulmonar, transmucosal, implantes, por bomba osmótica, cartucho, microbomba, oral y otros medios apreciados por los expertos en la técnica, como es bien conocido en la técnica.

Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar adicionalmente la preparación de las formulaciones y composiciones de la invención. El alcance de la invención no debe ser considerado como consistente únicamente en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Formulaciones comparativas

Materiales

| Item | Fabricante |
|---|---|
| r-hFSH masiva usada como candidato para las formulaciones | Laboratorios Serono SA |
| D-Manitol (DAB, Ph Eur, BP, FU, USP, FCC, E421) | Merck |
| Sacarosa (DAB, Ph Eur, BP, NF) | Merck |
| NaCl (ACS, ISO) | Merck |
| $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (GR para análisis) | Merck |
| $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (GR para análisis) | Merck |
| Alcohol bencílico (GR para análisis) | Merck |
| m-Cresol (para síntesis) | Merck |
| TWEEN 20 (polisorbato 20) (para síntesis) | Merck |
| Pluronic® F68 (Poloxámero 188) | Sigma |
| l-Metionina (para bioquímica) | Merck |
| Ácido ortofosfórico al 85% (Ph Eur, BP, NF) | Merck |
| Cartucho de vidrio de 1,5 ml | SFAM (con silicona Aguettant) |
| Cauchos de tipo A | West Company |
| Cierre alabeado | Aguettant |
| Millex-GV<br>Unidad de filtro con jeringa – Durapore | Millipore |
| Filtros de membrana Durapore de 0,22 μm GV | Millipore |
| Jeringa de plástico de 20 ml Plastipak | Becton Dickinson |
| Soporte de acero para filtración | Sartorius |

Equipo

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sistemas de HPLC | Detector modelo 486 ó 490<br>Controlador modelo 600S<br>Bomba modelo 626<br>Automuestreador modelo 717 | Waters | 2 |
| pH-metro | Modelo9 654 | Metrohm | 1 |
| Osmómetro | 030-D | Osmomat | 1 |

El siguiente estudio evaluó los siguientes parámetros para un gran número de formulaciones:

- Compatibilidad del tensioactivo y el agente bacteriostático
- Oxidación de la subunidad alfa

Las formulaciones eran formulaciones para dosis múltiples y estaban contenidas bien en TWEEN 20 o bien en Pluronic® F68, así como un agente bacteriostático. Se evaluaron los tres agentes bacteriostáticos siguientes:

- Alcohol bencílico al 0,9%
- m-Cresol al 0,3%

- Fenol al 0,5%

El TWEEN 20 y el Pluronic® F68 se usaron en el siguiente intervalo de concentraciones:

- TWEEN 20: intervalo de 10 a 100 μg/g
- Pluronic® F68: intervalo de 10 a 100 μg/g

Las disoluciones preparadas se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1: Formulaciones comparativas

| ID # | $Na_2HPO_4$ $2H_2O$ (mg/g) | $NaH_2PO_4$ $2H_2O$ (mg/g) | r-hFSH* | Pluronic® F68 (μg/g) | TWEEN 20 (μg/g) | Agente Bacteriostático | Excipiente (mg/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1P | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 10 | - | Fenol 0,5% | Sacarosa 70,6 |
| 2P | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 10 | - | Fenol 0,5% | Manitol 38,7 |
| 3P | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | Fenol 0,5% | Sacarosa 70,6 |
| 4P | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | Fenol 0,5% | Manitol 38,7 |
| 5P | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 10 | Fenol 0,5% | Sacarosa 70,6 |
| 6P | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 10 | Fenol 0,5% | Manitol 38.7 |
| 7 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | Alcohol bencílico 0,9% | NaCl 6,0 |
| 8 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa 62,3 |
| 9 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol 34,1 |
| 10 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | m-Cresol 0,3% | NaCl 7,6 |
| 11 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | m-Cresol 0,3% | Sacarosa 78,0 |
| 12 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | m-Cresol 0,3% | Manitol 42,7 |
| 13 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 10 | Alcohol bencílico 0,9% | NaCl 6,0 |
| 14 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 10 | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa 62,3 |
| 15 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 10 | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol 34,1 |
| 16 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 10 | m-Cresol 0,3% | NaCl 7,6 |
| 17 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 10 | m-Cresol 0,3% | Sacarosa 78,0 |
| 18 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 10 | m-Cresol 0,3% | Manitol 42,7 |
| 19 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | Alcohol bencílico 0,9% | NaCl 6,0 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 20 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa 62,3 |
| 21 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol 34,1 |
| 22 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | m-Cresol 0,3% | NaCl 7,6 |
| 23 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | m-Cresol 0,3% | Sacarosa 78.0 |
| 24 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | m-Cresol 0,3% | Manitol 42,7 |
| 25 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 10 | - | Alcohol bencílico 0,9% | NaCl 6,0 |
| 26 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 10 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa 62,3 |
| 27 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 10 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol 34,1 |
| 28 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 10 | - | m-Cresol 0,3% | NaCl 7,6 |
| 29 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 10 | - | m-Cresol 0,3% | Sacarosa 78.0 |
| 30 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 10 | - | m-Cresol 0,3% | Manitol 42,7 |

* Se añadió FSH a las formulaciones en función de su potencia biológica en lugar del contenido de proteína.

Del examen visual de las formulaciones se determinó que el TWEEN 20 no se puede usar con m-cresol y fenol porque las formulaciones de FSH que contienen TWEEN 20 y m-cresol o TWEEN 20 y fenol presentaban una suspensión blanca opalescente. Por el contrario, las formulaciones de FSH que contienen Pluronic® F68 no presentaron este problema con m-cresol y fenol. El uso del Pluronic® F68 permite el uso de fenol y m-cresol.

Combinación de FSH y Pluronic® F68 con antioxidantes

Se evaluó la capacidad de los siguientes antioxidantes para inhibir la oxidación de la subunidad $\alpha$ en presencia de Pluronic® F68:

- Metionina: intervalo de 10 a 100 $\mu$g/g
- Ácido ascórbico: intervalo de 10 a 100 $\mu$g/g

Se usaron sacarosa y manitol como agentes de tonicidad y se añadieron TWEEN 20 o Pluronic® a una concentración 100 $\mu$g/g.

Las formulaciones preparadas se listan en la Tabla 2.

Tabla 2: Formulaciones comparativas con y sin metionina

| ID # | $Na_2HPO_4$ $2H_2O$ (mg/g) | $NaH_2PO_4$ $H_2O$ (mg/g) | r-hFSH* | Pluronic® F68 ($\mu$g/g) | TWEEN ($\mu$g/g) | Ácido Ascórbico ($\mu$g/g) | Metionina ($\mu$g/g) | Agente Bacterios-tático | Excipiente |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 31 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | - | m-Cresol 0,3% | Sacarosa |
| 32 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | - | m-Cresol 0,3% | Manitol |
| 33 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | - | - | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 34 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | - | - | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol |
| 35 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | - | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa |
| 36 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | - | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol |
| 37 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | 10 | m-Cresol 0,3% | Sacarosa |
| 38 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | 10 | m-Cresol 0,3% | Manitol |
| 39 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | 100 | m-Cresol 0,3% | Sacarosa |
| 40 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | 100 | m-Cresol 0,3% | Manitol |
| 41 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 10 | - | m-Cresol 0,3% | Sacarosa |
| 42 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 10 | - | m-Cresol 0,3% | Manitol |
| 43 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 100 | - | m-Cresol 0,3% | Sacarosa |
| 44 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 100 | - | m-Cresol 0,3% | Manitol |
| 45 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | - | 10 | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa |
| 46 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | - | 10 | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol |
| 47 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | - | 100 | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa |
| 48 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | - | 100 | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol |
| 49 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | 10 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa |
| 50 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | 10 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol |
| 51 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | 100 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa |
| 52 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | - | 100 | 100 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol |
| 53 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | 10 | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa |
| 54 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | 10 | Alcohol bencílico | Manitol |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | 0,9% | |
| 55 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | 100 | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa |
| 56 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | 100 | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol |
| 57 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 10 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa |
| 58 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 10 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol |
| 59 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 100 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Sacarosa |
| 60 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 100 | - | Alcohol bencílico 0,9% | Manitol |
| 61 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | - | Fenol | Sacarosa |
| 62 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | - | Fenol | Manitol |
| 63 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | | | | | Fenol | Sacarosa |
| 64 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | 10 | Fenol | Manitol |
| 65 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | 100 | Fenol | Sacarosa |
| 66 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | - | 100 | Fenol | Manitol |
| 67 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 10 | - | Fenol | Sacarosa |
| 68 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 10 | - | Fenol | Manitol |
| 69 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 100 | - | Fenol | Sacarosa |
| 70 | 1,11 | 0,45 | 600 UI/g | 100 | - | 100 | - | Fenol | Manitol |
| * Se añadió FSH a las formulaciones en función de su potencia biológica en lugar del contenido de proteína. | | | | | | | | | |

Se prepararon 20 g de cada formulación en tubos de polipropileno Falcon y se filtraron a través de una unidad de filtro de jeringa Millex-GV de 0,22 μm, 3 $cm^2$, de Durapore, a continuación se analizaron según el siguiente esquema:

| Ensayo analítico | t = 0 | 1 semana | 2 semanas | 3 semanas | 4 semanas |
|---|---|---|---|---|---|
| HPLC en fase inversa para la subunidad alfa oxidada (%) | X | X | X | X | X |
| HPLC de exclusión de tamaño para la cuantificación de la proteína (μg/g) | X | X | X | X | X |
| HPLC de exclusión de tamaño cualitativa de las subunidades libres | X | X | X | X | X |
| (X): Ensayo realizado | | | | | |

La HPLC en fase inversa muestra que en las formulaciones que contienen FSH, Pluronic® F68, m-cresol y metionina (a 10 y 100 μg/ml), la oxidación de la subunidad α de la FSH cuando la formulación se almacena a 40ºC se redujo considerablemente frente a la formulación que no contenía metionina como se puede observar en la Figura 1. En función de la media de dos experimentos, en la formulación que no contiene metionina, el porcentaje de la subunidad α oxidada es 2,3 a t = 0, 4,0 a t = 1 semana y 7,1 a t = 2 semanas. En la formulación que contiene 10 μg/ml de metionina, el porcentaje de la subunidad α oxidada es 2,0 a t = 0, 3,2 a t = 1 semana y 3,8 a t = 2 semanas. En la formulación que contiene 100 μg/ml de metionina, el porcentaje de la subunidad α oxidada es 1,8 a t = 0, 1,7 a t = 1 semana y 1,3 a t = 2 semanas.

Ejemplo 2

Formulación para dosis única de FSH recombinante para inyección subcutánea o intramuscular.

En función de los resultados del Ejemplo 1, se preparó la siguiente formulación.

Los componentes 1 a 7 mostrados en la Tabla 3 se prepararon como disoluciones volumétricas en API. Se añadieron alícuotas de cada disolución a una vasija de mezcla para formar una “disolución madre”. La disolución madre se suministró en frascos de forma que contuvieran 10,9 microgramos (150 UI) o 5,45 microgramos (75 UI) de FSH. Con la FSH recombinante, la bioactividad y la actividad específica son consistentes, permitiendo que la FSH se dosifique por masa en vez de por bioensayo.

Tabla 3: Componentes de las formulaciones de FSH para dosis única

| Componente # | Descripción | 150 UI de FSH | 75 UI de FSH |
|---|---|---|---|
| 1 | rhFSH (μg/frasco) | 10,9 (150 UI) | 5,45 (75 UI) |
| 2 | Sacarosa (mg/frasco) | 15,00 | 7,50 |
| 3 | $NaH_2PO_4$ $H_2O$ (mg/frasco) | 0,111 | 0,0555 |
| 4 | $Na_2HPO_4$ $2H_2O$ (mg/frasco) | 0,273 | 0,1365 |
| 5 | Pluronic® F68 (mg/frasco) | 0,025 | 0,0125 |
| 6 | Metionina (mg/frasco) | 0,025 | 0,0125 |
| 7 | m-cresol (mg/frasco) | 0,75 | 0,375 |
| 8 | pH | 7,0 | 7,0 |
| 9 | API | c.s.p. 1 ml | c.s.p. 0,5 ml |

Los frascos se rellenaron y se sellaron en condiciones estériles. La formulación tiene una durabilidad de has dos años a temperatura ambiente.

Ejemplo 3

Formulación líquida para múltiples dosis de FSH recombinante para inyección subcutánea o intramuscular

En función de los resultados del Ejemplo 1, se preparó la siguiente formulación para dosis múltiples.

Los componentes 1 a 7 mostrados en la Tabla 4 se prepararon como disoluciones volumétricas en API. Se añadieron alícuotas de cada disolución a una vasija de mezcla para formar una “disolución madre”. La disolución madre se suministró en frascos de forma que contuvieran 22,2 microgramos (305 UI) o 33,3 microgramos (458 UI) y 66,7 microgramos (916 UI) de FSH. Las formulaciones resultantes permitían administrar un total de 300, 450 y 900 UI de FSH.

Los cartuchos se llenaron y se sellaron en condiciones estériles. La formulación para dosis múltiples se puede almacenar a o aproximadamente a 2-8ºC, más preferiblemente a o aproximadamente a 4-5ºC, hasta el primer uso durante hasta dos años. Después del primer uso, el cartucho debe almacenarse a o aproximadamente a 2-8ºC, más preferiblemente a o aproximadamente a 4-5ºC durante el periodo de dosis múltiples, que puede ser de 24 horas, 2 días o hasta 12 ó 14 días.

Tabla 4: Componentes de las formulaciones de FSH para múltiples dosis

| Comp. # | Descripción | 300 UI de FSH | 450 UI de FSH | 900 UI de FSH |
|---|---|---|---|---|
| 1 | rhFSH (μg/cartucho) | 22,2 (305 UI) | 33,3 (458 UI) | 66,7 (916 UI) |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2 | Sacarosa (mg/cartucho) | 30,0 | 45,00 | 90,0 |
| 3 | $NaH_2PO_4$ $H_2O$ (mg/cartucho) | 0,225 | 0,337 | 0,675 |
| 4 | $Na_2HPO_4$ $2H_2O$ (mg/cartucho) | 0,555 | 0,832 | 1,665 |
| 5 | Pluronic® F68 (mg/cartucho) | 0,050 | 0,075 | 0,150 |
| 6 | Metionina (mg/cartucho) | 0,050 | 0,075 | 0,150 |
| 7 | m-cresol (mg/cartucho) | 1,50 | 2,25 | 4,50 |
| 8 | pH | 7,0 | 7,0 | 7,0 |
| 9 | API | c.s.p. 0,5 ml | c.s.p. 0,75 ml | c.s.p. 1,5 ml |

Ejemplo 4

Formulación líquida para dosis única de LH recombinante para inyección subcutánea o intramuscular

Se preparó la siguiente formulación.

Los componentes 1 a 7 mostrados en la Tabla 5 se prepararon como disoluciones volumétricas en API. Se añadieron alícuotas de cada disolución a una vasija de mezcla para formar una “disolución madre”. La disolución madre se suministró en frascos de forma que contuvieran 3 microgramos (75 UI) de LH. La formulación resultante suministra una dosis única de 75 UI de LH.

Con la LH recombinante, la bioactividad y la actividad específica son consistentes, permitiendo que la LH se dosifique por masa en vez de por bioensayo.

| Tabla 5: Componentes de la formulación de LH para dosis única | | |
|---|---|---|
| Componente # | Descripción | 75 UI de LH |
| 1 | rhLH (μg/frasco) | 3,0 |
| 2 | Sacarosa (mg/frasco) | 52,5 |
| 3 | $NaH_2PO_4$ $H_2O$ (mg/frasco) | 0,052 |
| 4 | $Na_2HPO_4$ $2H_2O$ (mg/frasco) | 0,825 |
| 5 | Pluronic® F68 (mg/frasco) | 0,0125 |
| 6 | Metionina (mg/frasco) | 0,125 |
| 7 | m-cresol (mg/frasco) | 0,375 |
| 9 | API | c.s.p. 0,5 ml |

Los frascos se rellenaron y se sellaron en condiciones estériles. La formulación tiene una durabilidad de hasta dos años.

Ejemplo 5

Formulaciones para múltiples dosis de FSH y LH recombinantes (2:1) para inyección subcutánea o intramuscular.

Se prepararon las siguientes formulaciones para múltiples dosis de FSH y LH con una relación FSH:LH de 2:1.

Los componentes 1 a 8 mostrados en la Tabla 6 se prepararon como disoluciones volumétricas en API. Se añadieron alícuotas de cada disolución a una vasija de mezcla para formar una “disolución madre”. El pH de la disolución madre se ajustó a 8,0, si era necesario, por adición de NaOH o de HCl. La disolución madre se suministró en cartuchos de forma que contuvieran 18,3 microgramos (457 UI) de LH con 66,7 microgramos (916 UI) de FSH, previstos para 6 dosis de 150 UI de FSH cada una; 9,2 microgramos (230 UI) de LH con 33,3 microgramos (458 UI) de FSH, previstos para 3 dosis de 150 UI de FSH cada una de FSH; y 6,1 microgramos (152,5 UI) de LH con 22,23 microgramos (305 UI) de FSH, previstos para 2 dosis de 150 UI de FSH cada una.

Los cartuchos se llenaron y se sellaron en condiciones estériles. La formulación para dosis múltiples se puede almacenar a o aproximadamente a 2-8ºC, más preferiblemente a o aproximadamente a 4-5ºC, hasta el primer uso durante hasta dos años. Después del primer uso, el cartucho debe almacenarse a o aproximadamente a 2-8ºC, más preferiblemente a o aproximadamente a 4-5ºC durante el periodo de dosis múltiples, que puede ser de 24 horas, 2

días o hasta 12 ó 14 días.

| Tabla 6: Componentes de las formulaciones líquidas de FSH y LH (2:1) para múltiples dosis | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Componente. # | Descripción | 6 dosis | 3 dosis | 2 dosis |
| 1 | rhLH (μg/cartucho) | 18,3 (457 UI) | 9,2 (230 UI) | 6,1 (152,5 UI) |
| 2 | rhFSH (μg/cartucho) | 66,7 (916 UI) | 33,3 (458 UI) | 22,23 (305 UI) |
| 3 | Sacarosa (mg/cartucho) | 115,5 | 57,75 | 38.5 |
| 4 | $H_3PO_4$ (mg/cartucho) | 1.35 | 0,735 | 0,49 |
| 5 | NaOH (mg/cartucho) | c.s.p. pH 8,0 | c.s.p. pH 8,0 | c.s.p. pH 8,0 |
| 6 | Pluronic® F68 (mg/cartucho) | 375,0 | 187,5 | 125,0 |
| 7 | Metionina (mg/cartucho) | 225 | 112,5 | 75,0 |
| 8 | m-cresol (mg/cartucho) | 4,5 | 2,25 | 1,5 |
| 9 | pH | 8,0 | 8,0 | 8,0 |
| 10 | API | c.s.p. 1,5 ml | c.s.p. 0,75 ml | c.s.p. 0,5 ml |

Ejemplo 6

Formulaciones para múltiples dosis de FSH y LH recombinantes (1:1) para inyección subcutánea o intramuscular.

Se prepararon las siguientes formulaciones para múltiples dosis de FSH y LH con una relación FSH:LH de 1:1.

Los componentes 1 a 8 mostrados en la Tabla 7 se prepararon como disoluciones volumétricas en API. Se añadieron alícuotas de cada disolución a una vasija de mezcla para formar una “disolución madre”. El pH de la disolución madre se ajustó a 8,0, si era necesario, por adición de NaOH o de HCl. La disolución madre se suministró en cartuchos de forma que contuvieran 36,6 microgramos (914 UI) de LH con 66,7 microgramos (916 UI) de FSH, previstos para 6 dosis de 150 UI de FSH cada una; 18,4 microgramos (460 UI) de LH con 33,3 microgramos (458 UI) de FSH, previstos para 3 dosis de 150 UI de FSH cada una; y 12,2 microgramos (305 UI) de LH con 22,23 microgramos (305 UI) de FSH, previstos para 2 dosis de 150 UI de FSH cada una.

Los cartuchos se llenaron y se sellaron en condiciones estériles. La formulación para dosis múltiples se puede almacenar a o aproximadamente a 2-8ºC, más preferiblemente a o aproximadamente a 4-5ºC, hasta el primer uso durante hasta dos años. Después del primer uso, el cartucho debe almacenarse a o aproximadamente a 2-8ºC, más preferiblemente a o aproximadamente a 4-5ºC durante el periodo de dosis múltiples que puede ser de 24 horas, 2 días o hasta 12 ó 14 días.

| Tabla 7: Componentes de las formulaciones líquidas de FSH y LH (1:1) para múltiples dosis | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Comp. # | Descripción | 6 dosis | 3 dosis | 2 dosis |
| 1 | rhLH (μg/cartucho) | 36,6 (914 UI) | 18,4 (460 UI) | 12,2 (305 UI) |
| 2 | rhFSH (μg/cartucho) | 66,7 (916 UI) | 33,3 (458 UI) | 22,23 (305 UI) |
| 3 | Sacarosa (mg/cartucho) | 115,5 | 57,75 | 38,5 |
| 4 | $H_3PO_4$ (mg/cartucho) | 1.35 | 0,735 | 0,49 |
| 5 | NaOH (mg/cartucho) | c.s.p. pH 8,0 | c.s.p. pH 8,0 | c.s.p. pH 8,0 |
| 5 | Pluronic® F68 (mg/frasco) | 375,0 | 187,5 | 125,0 |
| 6 | Metionina (μg/cartucho) | 225 | 112,5 | 75,0 |
| 7 | m-cresol (mg/cartucho) | 4,5 | 2,25 | 1,5 |
| 8 | pH | 8,0 | 8,0 | 8,0 |
| 9 | API | c.s.p. 1,5 ml | c.s.p. 0,75 ml | c.s.p. 0,5 ml |

Ejemplo 7

Experimentos de estabilidad para las formulaciones líquidas para múltiples dosis de FSH mezclada con LH.

7.1.- Análisis por HPLC en fase inversa del contenido de proteína

Se evaluó el contenido de proteína en la formulación del ejemplo 5 (6 dosis), tanto para la FSH como para la LH, usando el método de HPLC en fase inversa.

El contenido de proteína (FSH y LH) se midió en el tiempo cero y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento de la formulación a 4ºC. Los resultados se muestran en la tabla 8 en microgramos de FSH o de LH por gramo de disolvente.

7.2.- Ensayo de la subunidad alfa oxidada

Se midió el porcentaje de subunidad alfa oxidada en una formulación del ejemplo 5 mediante un método de HPLC en fase inversa (RP-HPLC).

El porcentaje de subunidad alfa oxidada se midió en el tiempo cero y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento a 4ºC. Los resultados se muestran en la tabla 8.

7.3.- Ensayo *in vivo* para la FSH

Se analizó la actividad de la FSH en la formulación del ejemplo 5 (6 dosis) usando el bioensayo de ganancia de peso ovárico de Steelman-Pohley en el tiempo cero y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento a 4ºC. Los resultados se muestran en la tabla 8 en unidades internacionales (UI) por gramo de disolvente.

7.4.- Ensayo *in vivo* para la LH

Se analizó la actividad de la LH en la formulación del ejemplo 5 (6 dosis) usando el bioensayo de ganancia de peso de la vesícula seminal en ratas en el tiempo cero y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento a 4ºC. Los resultados se muestran en la tabla 8 en unidades internacionales (UI) por gramo de disolvente.

7.5.- Evaluación de la subunidad libre (rFSH + rLH)

Se evaluó el porcentaje de subunidad libre en una formulación del ejemplo 5 por SDS-PAGE.

Las medidas se realizaron en el tiempo cero y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento a 4ºC. Los resultados se dan como porcentaje de la proteína total (rFSH + rLH) y se muestran en la tabla 8.

7.5.- Evaluación de agregados

Se evaluó el porcentaje de agregados en una formulación del ejemplo 5 por SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente para la evaluación de la subunidad libre en 7.5, excepto que los agregados de mayor peso molecular se determinaron como el porcentaje de la proteína total (rFSH + rLH). Las medidas se realizaron en el tiempo cero y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento a 4ºC. Los resultados se muestran en la tabla 8.

7.6.- Partículas visibles

Se evaluaron las partículas visualmente en la formulación del ejemplo 5 en el tiempo cero y después de 3 y 6 meses de almacenamiento a 4ºC. Los resultados se muestran en la tabla 8.

7.7.- pH

El pH de una formulación del ejemplo 5 se midió en el tiempo cero y después de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento a 4ºC. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Parámetros analíticos para una formulación líquida de FSH y LH (2:1) en el tiempo cero y después de almacenamiento a 4ºC durante 1, 2, 3 y 6 meses

| Análisis | Tiempo 0 | 1 mes | 2 meses | 3 meses | 6 meses |
|---|---|---|---|---|---|
| Contenido de rFSH por RP-HPLC (microgramos/g) | 46,50 | 46,98 | 46,71 | 46,31 | 44,98 |
| Contenido de rLH por RP-HPLC (microgramos/g) | 11,74 | 11,81 | 12,68 | 12,67 | 13,21 |
| % de subunidad alfa oxidada | 2,29 | 2,17 | 2,08 | 2,48 | 2,95 |
| Análisis *in vivo* para la FSH 553 (UI/g) | 566 | No | No | No | 578 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | analizado | analizado | analizado | (23 semanas) |
| Análisis *in vivo* para la LH (UI/g) | 331 | No analizado | No analizado | 311 | 286 |
| Subunidad libre por SDS-PAGE (rFSH + rLH; %) | ≤ 5 | No analizado | No analizado | ≤ 5 | ≤ 5 (23 semanas) |
| Agregados por SDS-PAGE (rFSH + rLH; %) | ≤ 2 | No analizado | No analizado | >3 | 4 |
| Partículas visibles | No | No analizado | No analizado | No | No |
| pH | 8,262 | 8,125 | 8,216 | 8,188 | 8,283 |

Ejemplo 8

Formulación liofilizada de FSH y LH para múltiples dosis

Se prepararon dos formulaciones liofilizadas A y B que tenían las siguientes composiciones:

Formulación A

| | |
|---|---|
| FSH | μg 32,75 (450 UI) |
| LH | μg 9,0 (225 UI) |
| Sacarosa | mg 15,0 |
| $NaH_2PO_4\,H_2O$ | mg 0,052 |
| $Na_2HPO_4\,2H_2O$ | mg 0,825 |
| Pluronic® F68 | mg 0,05 |
| L-Metionina | mg 0,05 |

Formulación B

| | |
|---|---|
| FSH | μg 65,5 (900 UI) |
| LH | μg 18,0 (450 UI) |
| Sacarosa | mg 30,0 |
| $NaH_2PO_4\,H_2O$ | mg 0,104 |
| $Na_2HPO_4\,2H_2O$ | mg 1,65 |
| Pluronic® F68 | mg 0,10 |
| L-Metionina | mg 0,10 |

El procedimiento de elaboración consistió en mezclar la sustancia fármaco directamente con los ingredientes, filtrar la disolución obtenida y liofilizar el filtrado.

Una descripción de cada etapa del procedimiento se da a continuación:

- Añadir en un frasco aforado API, hidrógeno-fosfato de disodio dihidratado, dihidrógeno-fosfato de sodio monohidratado, sacarosa, Pluronic® F68 al 5% y L-metionina y agitar durante 10 minutos hasta que la disolución es completa.
- Controlar el pH y opcionalmente corregirlo a pH 7,00 ± 0,2 con NaOH al 10% o $H_3PO_4$ diluido.
- Añadir FSH y LH a la mezcla preparada anteriormente y agitar suavemente la disolución obtenida durante 10 minutos.

- Controlar de nuevo el pH y opcionalmente ajustarlo a pH 7,0 ± 0,1 con NaOH al 10% o $H_3PO_4$ diluido.
- Filtrar la disolución con una membrana Durapore de 0,22 μm con una relación de filtración no menor de 15 g/cm$^2$, con una corriente de nitrógeno gaseoso con una presión no superior a 1,5 atm.
- Recoger la disolución en un frasco previamente esterilizado.
- Rellenar el frasco de vidrio con la disolución filtrada, poner el tapón y colocar los frascos rellenos en una bandeja de aluminio inoxidable.
- Cargar las bandejas en el liofilizador y liofilizar el producto usando el siguiente ciclo de liofilización:
    - Equilibrar a +4ºC durante aproximadamente 20 minutos.
    - Llevar los estantes a una temperatura de -25ºC y mantenerla durante 2 horas.
    - Llevar los estantes a una temperatura de -15ºC y mantenerla durante 1 hora.
    - Llevar los estantes a una temperatura de -45ºC y mantenerla durante 3 horas.
    - Llevar el condensador a una temperatura de -65ºC.
    - Aplicar vacío a la cámara.
    - Cuando el vacío alcance un valor de $7x10^{-2}$ mbares, subir la temperatura del estante hasta -10ºC y mantenerla durante 14 horas.
    - Aumentar la temperatura del estante hasta +35ºC en 8 horas y mantenerla hasta el final del ciclo (14 horas).
    - Romper el vacío permitiendo la entrada de nitrógeno en la cámara.
    - Realizar el taponado con el sistema automático del liofilizador.
    - Sellar los frascos tapados con tapones abatibles adecuados.

Las formulaciones A y B se han almacenado a 25 ± 2ºC y se ha evaluado su estabilidad y actividad biológica como se indica a continuación. Antes de analizar las composiciones, se han reconstituido usando agua para inyección que comprendía 0,3% de m-cresol como agente bacteriostático.

Los valores de estabilidad y actividad biológica se determinaron como sigue:

- Análisis in vivo para la FSH: se analizó la actividad FSH de la formulación usando el bioensayo de ganancia de peso ovárico de Steelman-Pohley.
- Análisis in vivo para la LH: se analizó la actividad LH de la formulación usando el bioensayo de ganancia de peso de la vesícula seminal en ratas.
- Análisis de la subunidad alfa oxidada: el porcentaje de subunidad alfa oxidada se midió mediante un método de HPLC en fase inversa (RP-HPLC).
- Evaluación de la subunidad libre (rFSH + rLH): el porcentaje de subunidad libre se evaluó por SDS-PAGE.
- Evaluación de agregados: el porcentaje de agregados se evaluó por SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente para la evaluación de la subunidad libre.

Los análisis biológicos se han realizado cumpliendo con las regulaciones de la Farmacopea Europea. En particular, los análisis se han publicado en la monografía “Menotropin”.

La tabla 9 resume los resultados de los ensayos analíticos relacionados con la estabilidad y la actividad biológica de la formulación A. Los valores se determinaron en 4 puntos de control: a tiempo cero, después de 1 mes, 3 meses y 6 meses de almacenamiento, a una temperatura de almacenamiento de 25 ± 2ºC.

Tabla 9

| Ensayo | Tiempo cero | 1 mes | 3 meses | 6 meses |
|---|---|---|---|---|
| Actividad biológica FSH U.I. | 416 | 420 | 415 | 417 |
| Actividad biológica LH U.I. | 276 | 250 | 259 | 270 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| % de producto oxidado | 1,95 | 1,81 | 1,95 | 1,57 |
| % de dímeros/agregados | < 2 | < 2 | < 2 | < 2 |
| % de subunidades libres | < 5 | < 5 | < 5 | < 5 |

La tabla 10 resume los resultados de los ensayos analíticos relacionados con la estabilidad y la actividad biológica de la formulación B. Los valores se determinaron en 4 puntos de control: a tiempo cero, después de 3 meses, 6 meses y 9 meses de almacenamiento, a una temperatura de almacenamiento de 25 ± 2ºC.

Tabla 10

| Ensayo | Tiempo cero | 3 meses | 3 meses | 6 meses |
|---|---|---|---|---|
| Actividad biológica FSH U.I. | 821 | 850 | 830 | 838 |
| Actividad biológica LH U.I. | 570 | 564 | 580 | 622 |
| % de producto oxidado | 1,0 | 0,9 | 1,0 | 1,0 |
| % de dímeros/agregados | < 2 | < 2 | < 2 | < 2 |
| % de subunidades libres | < 5 | < 5 | < 5 | < 5 |

De las tablas 9 y 10 se puede concluir que la actividad biológica de las formulaciones A y B se conserva bien después de 9 meses de almacenamiento. Las formulaciones tienen una estabilidad elevada.

La elevada estabilidad no es afectada por cantidades grandes de FSH recombinante y LH recombinante.

Secuencias:

SEQ. ID. Nº 1: subunidad $\alpha$ de glicoproteína humana;

SEQ. ID. Nº 2: subunidad $\beta$ de la hFSH;

SEQ. ID: Nº 3: variante 1 de la subunidad $\beta$ de la hFSH;

SEQ. ID: Nº 4: variante 2 de la subunidad $\beta$ de la hFSH;

SEQ. ID: Nº 5: variante 3 de la subunidad $\beta$ de la hFSH;

SEQ. ID: Nº 6: subunidad $\beta$ de la hLH.

**Referencias**

[1] Burgues et al.; Subcutaneous self-administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotrophic hypogonadism. Spanish Collaborative Group on Male Hypogonadotrophic Hypogonadism; Hum. Reprod.; 1997, 12, 980-6.

[2] Shome et al.; J. Clin. Endocrinol. Metab. 39: 187-205 (1974) ; Shome et al., J. Prot. Chem., 7: 325-339, 1988.

[3] Keutmann et al., Structure of human luteinizing hormone beta subunit: evidence for related carboxyl-terminal sequence among certain peptide hormones; Biochem. Byophys. Res. Commun.; 1979, 90, 842-848; Talmadge et al.; Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone; Nature; 1984, 307, 37-40; Fiddes & Talmadge; Structure, expression and evolution of the gene for the human glycoprotein hormones; Recent Prog. Horm. Res.; 1984, 40, 43-78.

[4] Reichert, L. E., Ramsey, R. B.; Dissociation of human follicle-stimulating hormone; J. Biol. Chem; 1975, 250, 3034-3040.

[5] Klein et al.; Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotrophin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey; Fertility & Sterility; 2002, 77, 1248-1255.

[6] a) Fiddes, J. C. et al., J. of Mol. and Applied Genetics, 1: 3-18 (1981); b) Esch F. S. et al.; DNA 5: 363-369 (1986); c) Watkings P. C. et al., DNA 6: 205-212 (1987); d) Hirai, T. et al., J. Mol. Endocrinol. 5: 147-158 (1990) ; e) Maurer, R. A. et al., Mol. Endocrinol. 1: 717-723 (1987); f) Guzman, K. et al., DNA Cell Biol. 10: 593-601 (1991); g) Kumar T. R. et al., Gene, 1995 diciembre 12; 166 (2): 335-6; h) Kumar, T. R. et al., Gene 1995 Diciembre 12; 166 (2): 333-4.

[7] Biochem. Biophys. Res. Commun.; 1979, 90, 842-848.

[8] Steelman et al.; Assay of the follicle stimulating hormona based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin; Endocrinology, 1953, 53, 604-616.

[9] Van Hell et al., Effects of human menopausal gonadotrophin preparations in different bioassay methods; Acta Endocrinologica, 1984, 47, 409-418.

[10] Van Hell et al.; Effects of human menopausal gonadotrophin preparations in different bioassay methods; Acta Endocrinologica, 1964, 47, 409-418.

**Listado de secuencias**

<110> ARES TRADING SA

<120> Formulaciones de FSH y de variantes de FSH

<130> US 847 Y

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 91
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro
1               5                  10                  15

Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys
            20                  25                  30

Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu
        35                  40                  45

Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser
    50                  55                  60

Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Val Glu Asn His Thr Ala
65                  70                  75                  80

Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
                85                  90
```

<210> 2
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile
1               5                  10                  15

Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys
            20                  25                  30

Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
        35                  40                  45

Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys
    50                  55                  60

Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg
65                  70                  75                  80

Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
                85                  90                  95

Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
            100                 105                 110

Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Me t Lys
        115                 120                 125

Glu
```

<210> 3
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu


  1               5                  10                  15

  Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys
              20                  25                  30

  Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln
          35                  40                  45

  Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro
      50                  55                  60

  Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr
  65                  70                  75                  80

  Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val
                  85                  90                  95

  Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu
              100                 105
```

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu Cys Arg
1               5                   10                  15

Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr Arg
            20                  25                  30

Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln Lys Thr Cys
        35                  40                  45

Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro Gly Cys Ala
    50                  55                  60

His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Val Pro Val Ala Thr Gln Cys His
65                  70                  75                  80

Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu
                85                  90                  95

 Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met
            100                 105
```

<210> 5
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

```
Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu
1               5                   10                  15

Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys
            20                  25                  30

Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln
        35                  40                  45

Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro
    50                  55                  60

Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr
65                  70                  75                  80

Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val
                85                  90                  95

Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys
            100                 105                 110
```

<210> 6
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Ser Arg Glu Pro Leu Arg Pro Trp Cys His Pro Ile Asn Ala Ile Leu
1               5                  10                  15

Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr Val Asn Thr Thr
            20                  25                  30

Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Arg Val Leu Gln Ala Val Leu
        35                  40                  45

Pro Pro Leu Pro Gln Val Cys Thr Tyr Arg Asp Val Arg Phe Glu Ser
    50                  55                  60

Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val Asp Pro Val Val Ser Phe
65                  70                  75                  80

Pro Val Ala Leu Ser Cys Arg Cys Gly Pro Cys Arg Arg Ser Thr Ser
                85                  90                  95

Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu Thr Cys Asp His Pro Gln
            100                 105                 110
```

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica líquida que comprende la hormona estimulante de folículo (FSH) o una de sus variantes, así como un tensioactivo que es poloxámero 188 y que además comprende metionina y un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol, y sacarosa.

2. Una composición farmacéutica líquida que comprende la hormona estimulante de folículo (FSH) o una de sus variantes y la hormona luteinizante (LH) o una de sus variantes, así como un tensioactivo que es poloxámero 188 y que además comprende metionina, un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol, y sacarosa.

3. Una composición farmacéutica líquida que comprende la hormona luteinizante (LH) o una de sus variantes, así como un tensioactivo que es poloxámero 188 y que además comprende metionina y un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol, y sacarosa.

4. Una composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la hormona estimulante de folículo (FSH) está presente en una concentración de justo o aproximadamente 150 UI/ml hasta justo o aproximadamente 1.200 UI/ml.

5. Una composición farmacéutica líquida según la reivindicación 4, en la que la hormona estimulante de folículo (FSH) está presente en una concentración de justo o aproximadamente 300 UI/ml hasta justo o aproximadamente 900 UI/ml.

6. Una composición farmacéutica líquida según la reivindicación 5, en la que la hormona estimulante de folículo (FSH) está presente en una concentración de justo o aproximadamente 600 UI/ml.

7. Una composición farmacéutica líquida según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en la que la hormona luteinizante (LH) está presente en una concentración de justo o aproximadamente 150 UI/ml hasta justo o aproximadamente 1.200 UI/ml.

8. Una composición farmacéutica líquida según la reivindicación 7, en la que la hormona luteinizante (LH) está presente en una concentración de justo o aproximadamente 300 UI/ml hasta justo o aproximadamente 750 UI/ml.

9. Un artículo elaborado que comprende una formulación liofilizada que comprende la hormona estimulante de folículo (FSH) o una de sus variantes, un tensioactivo que es poloxámero 188 así como metionina y sacarosa, comprendiendo además el artículo elaborado un disolvente para reconstitución que contiene un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol.

10. Un artículo elaborado que comprende una formulación liofilizada que comprende la hormona luteinizante (LH) o una de sus variantes, un tensioactivo que es poloxámero 188 así como metionina y sacarosa, comprendiendo además el artículo elaborado un disolvente para reconstitución que contiene un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol.

11. Un artículo elaborado que comprende una formulación liofilizada que comprende la hormona estimulante de folículo (FSH) o una de sus variantes así como la hormona luteinizante (LH) o una de sus variantes, un tensioactivo que es poloxámero 188 así como metionina y sacarosa, comprendiendo además el artículo elaborado un disolvente para reconstitución que contiene un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol.

12. El artículo elaborado según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la hormona estimulante del folículo (FSH) está presente en una concentración (peso/peso) de justo o aproximadamente 0,1 a 10 μg/mg de la formulación total.

13. El artículo elaborado según la reivindicación 12, en el que la hormona estimulante del folículo (FSH) está presente en una concentración de justo o aproximadamente 0,3 a 5 μg/mg de la formulación total.

14. El artículo elaborado según la reivindicación 13, en el que la hormona estimulante del folículo (FSH) está presente en una concentración de justo o aproximadamente 0,37 a 2 μg/mg de la formulación total.

15. El artículo elaborado según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la hormona luteinizante (LH) está presente en una concentración de justo o aproximadamente 0,1 a 3 μg/mg de la formulación total.

16. El artículo elaborado según la reivindicación 15, en el que la hormona luteinizante (LH) está presente en una concentración de justo o aproximadamente 0,1 a 1 μg/mg de la formulación total.

17. El artículo elaborado según la reivindicación 16, en el que la hormona luteinizante (LH) está presente en una concentración de justo o aproximadamente 0,1 a 0,6 μg/mg de la formulación total.

18. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la hormona estimulante del folículo es una hormona estimulante del folículo humana y/o la hormona luteinizante (LH) es una hormona luteinizante (LH) humana.

19. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según la reivindicación 18, en la que la hormona estimulante del folículo es una hormona estimulante del folículo humana urinaria y/o la hormona luteinizante (LH) es una hormona luteinizante (LH) humana urinaria.

20. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según la reivindicación 18, en la que la hormona estimulante del folículo es una hormona estimulante del folículo humana recombinante y/o la hormona luteinizante (LH) es una hormona luteinizante (LH) humana recombinante.

21. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación entre la FSH y la LH está en el intervalo de justo o aproximadamente 6:1 hasta justo o aproximadamente 1:6.

22. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según la reivindicación 21, en la que la relación entre la FSH y la LH está en el intervalo de justo o aproximadamente 4:1 hasta justo o aproximadamente 1:2.

23. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según la reivindicación 22, en la que la relación entre la FSH y la LH está en el intervalo de justo o aproximadamente 3:1 hasta justo o aproximadamente 1:1.

24. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según la reivindicación 23, en la que la relación entre la FSH y la LH está en el intervalo de justo o aproximadamente 2:1 y 1:1.

25. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el agente bacteriostático es m-cresol.

26. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según la reivindicación 25, que comprende m-cresol a una concentración de justo o aproximadamente 0,3% (masa/masa de disolvente).

27. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además sacarosa.

28. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según la reivindicación 27, que comprende además un tampón de fosfato a un pH de justo o aproximadamente 7,0.

29. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según la reivindicación 28, que comprende los siguientes ingredientes: rFSH, poloxámero 188, sacarosa, metionina, m-cresol y una disolución acuosa tampón de fosfato de pH justo o aproximadamente a 7,0.

30. Una composición farmacéutica o artículo elaborado según la reivindicación 29, en la que la rFSH está presente a una concentración de justo o aproximadamente 600 UI/ml, el poloxámero 188 está presente a una concentración de justo o aproximadamente 0,1 mg/ml, la sacarosa está presente a una concentración de justo o aproximadamente 60 mg/ml, la metionina está presente a una concentración de justo o aproximadamente 0,1 mg/ml, el m-cresol está presente a una concentración de justo o aproximadamente 3 mg/ml y el tampón de fosfato es de justo o aproximadamente 10mM en fosfato.

31. Un artículo elaborado según la reivindicación 11, que comprende 32,75 μg de FSH recombinante, 9,0 μg de LH recombinante, 15,0 mg de sacarosa, 0,052 mg de $NaH_2PO_4.H_2O$, 0,825 mg de $Na_2HPO_4.2H_2O$, 0,05 mg de poloxámero 188 y 0,05 mg de L-metionina.

32. Un artículo elaborado según la reivindicación 11, que comprende 65,5 μg de FSH recombinante, 18,0 μg de LH recombinante, 30,0 mg de sacarosa, 0,104 mg de $NaH_2PO_4.H_2O$, 1,65 mg de $Na_2HPO_4.2H_2O$, 0,10 mg de poloxámero 188 y 0,10 mg de L-metionina.

33. Un método para elaborar una composición farmacéutica que comprende la etapa de formar una disolución de FSH, un tensioactivo que es poloxámero 188 y un diluyente líquido y añadir además metionina y un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol, y sacarosa.

34. Un método para elaborar una composición farmacéutica envasada que comprende colocar una disolución que comprende FSH, un tensioactivo que es poloxámero 188 y colocar además metionina y un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol, y sacarosa, en un frasco, ampolla o cartucho.

35. Un método para elaborar un artículo elaborado según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que comprende la etapa de formar una mezcla de FSH con o sin LH, o LH sola, así como un tensioactivo que es poloxámero 188, añadir metionina y sacarosa, y someter la mezcla a liofilización, y proporcionar un disolvente para reconstitución que contiene un agente bacteriostático elegido entre fenol y m-cresol.

Figura 1


T=0
1 Semana
2 Semanas
% alfa oxidada
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Sin Metionina
Met 10 mcg/ml
Met 100 mcg/ml