

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97 074

REQUERENTE: AKZO N.V., holandesa, com sede em Velperweg
76, 6824 BM Arnhem, Holanda

EPÍGRAFE: "Processo de produção de preparações estabili
zadas de gonadotropina"

INVENTORES: Andreas Leo Johannes De Meere e Marinus Arie
De Ruiter

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Patente Europeia em 20 de Março de 1990 sob o nº.
90 200665 9



PATENTE Nº. 97 074

"Processo de produção de preparações estabilizadas de gonadotropina"

para que

AKZO N.V., pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo para produzir um liofilizado de gonadotropina estabilizado, caracterizado por compreender:

a mistura, em solução aquosa, de pelo menos uma gonadotropina com uma quantidade de sal de ácido dicarboxílico suficiente para ajustar a força iónica da referida solução entre 0,050 e 0,350,

a dissolução, na referida mistura, de um açúcar não redutor numa quantidade de cerca de três a cinquenta vezes a quantidade, em peso, do sal de ácido dicarboxílico, e

a criodessecação da referida mistura, a uma temperatura superior a -35° centígrados, para formar o referido liofilizado de gonadotropina estabilizado.

MEMÓRIA DESCRITIVA



Antecedentes do invento

Campo. Este invento refere-se na generalidade, a composições farmacêuticas, e especificamente, a preparações estabilizadas contendo gonadotropinas..

Estado da Arte: Encontram-se disponíveis comercialmente preparações de gonadotropina relativamente pura. Por exemplo, composições contendo gonadotropinas humanas da menopausa derivadas naturalmente ("HMG") e gonadotropinas coriônicas humanas derivadas naturalmente ("HCG") encontram-se disponíveis como preparações criodessecadas sob as designações comerciais de "Humegon" e "Pregnyl" respectivamente, na Organon International, bv da Oss, NL. Gonadotropina de égua grávida está também disponível numa forma criodessecada, na mesma companhia.

Antes da liofilização, adiciona-se, a estas preparações, um agente aumentador de volume, e.g. manitol. Elas não requerem a adição de um estabilizador para assegurar uma vida em prateleira adequada. Evidentemente, quaisquer contaminantes naturais que permaneçam após o processo de purificação actuam no sentido de estabilizar as preparações na forma criodessecada.

No entanto, recentemente, com o advento de técnicas de produção e purificação mais eficazes, as preparações de certas gonadotropinas muito puras são insuficientemente estáveis. Degradam-se num espaço de tempo relativamente curto, perdendo actividade. Para impedir ou retardar esta degradação, foram feitas tentativas para criodessecar as preparações (liofilizar). No entanto a liofilização foi apenas parcialmente bem sucedida.

Existe a necessidade de uma preparação farmacêutica contendo gonadotropina que seja estável durante um período de tempo suficientemente longo para o produto ser fabricado, transportado e armazenado antes de ser usado. Esta necessidade é especialmente grande para uma preparação estável contendo mais do que uma gona-



dotropina.

Sumário do invento

Na generalidade, o invento inclui uma preparação de proteína liofilizada contendo gonadotropina que tem um estabilizador de sal de ácido dicarboxílico. Por "ácido dicarboxílico" tal como aqui usado entende-se um ácido orgânico com duas ou mais porções de ácido carboxílico (e.g. HOOC-R-COOH). A gonadotropina será misturada com, e será pelo menos parcialmente capaz de ser estabilizada pelo estabilizador particular em sistemas liofilizados. A preparação conterá uma quantidade suficiente de sal de ácido dicarboxílico para estabilizar a gonadotropina na sua forma criodessecada durante um tempo desejado a uma temperatura desejada.

Os sais de ácido dicarboxílico, típicos, são sais de ácido cítrico, ácido tartárico, ácido aspártico, ou de misturas destes ácidos. A gonadotropina ou derivados de gonadotropina ("gonadotropinas" como aqui são referidas) serão, tipicamente, proteínas tais como a hormona estimuladora do folículo (FSH), hormona estimuladora da tiróide (TSH), gonadotropina coriônica humana (HCG), ou hormona luteinizante (LH). A preparação pode também incluir um dissacárido não redutor, tal como a sacarose ou trealose.

O invento também inclui um processo de estabilização de uma gonadotropina essencialmente pura, na forma liofilizada. este processo envolve a mistura da gonadotropina, em solução, com uma quantidade suficiente de um sal de ácido dicarboxílico para estabilizar a proteína na forma liofilizada, e depois, a criodessecação da solução resultante para formar um liofilizado estabilizado da gonadotropina.

Por último, o invento inclui ainda a preparação injectável reconstituída feita a partir do liofilizado. A preparação injectável consiste essencialmente numa solução aquosa de água para injeção, na gonadotropina, num açúcar não redutor, num agente anti-adsorção, e no sal de ácido dicarboxílico.

Breve Descrição das Figuras



A FIG. 1 é um gráfico que representa a correlação entre a força iônica ($\times 1000$) e a quantidade de actividade de FSH recombinante recuperada após 1 mês a 60°C usando vários estabilizadores.

A FIG. 2 é um gráfico que representa o efeito da razão citrato/proteína (peso/peso) na recuperação da actividade da HCG.

Descrição das Concretizações Preferidas

A. Gonadotropinas

As gonadotropinas preferidas são as derivadas de FSH, TSH, HCG, LH e suas misturas, com ou sem outros componentes proteicos. A hormona estimuladora do folículo, a hormona estimuladora da tiróide, a gonadotropina coriônica humana e a hormona luteinizante são todas proteínas quimicamente relacionadas que consistem em subunidades α e β . As subunidades α destas proteínas são idênticas ou aproximadamente idênticas.

A hormona estimuladora do folículo é uma glicoproteína hormonal da pituitária anterior, necessária para a função reprodutiva normal. A hormona estimuladora do folículo tem sido usada para estimular o desenvolvimento dos folículos do ovário para a fertilização in vitro, e tem sido usada também clinicamente para estimular a maturação folicular em mulheres anovulares com o síndrome anovular crônico ou de deficiência da fase luteal. A hormona estimuladora do folículo pode ser pelo menos parcialmente isolada a partir de fontes naturais, tal como a urina humana. As hormonas estimuladoras do folículo recombinantes e/ou LH podem ser preparadas como descrito em Keene et al "Expression of Biologically Active Human Follicle Stimulating Hormone in Chinese Hamster Ovary Cell", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 264, pp. 4769-4775 (25 de Março de 1989), cujo conteúdo é aqui incorporado para referência. Tal como é aqui usado, uma gonadotropina, por exemplo a hormona estimuladora do folículo (FSH), inclui os análogos do composto e seus recombinantes nas formas natural, desglicosada, não glicosada.



da, glicosada modificada e outras.

A gonadotropina mais preferida é FSH produzida por técnicas de ADN recombinante (rFSH), sozinha ou num liofilizado com LH ou HCG. A FSH purificada a partir de fontes naturais é geralmente apenas parcialmente purificada. As impurezas parecem actuar no sentido de as estabilizar um pouco. No entanto, com a rFSH as impurezas não estão presentes, logo a FSH é mais susceptível a uma rápida degradação e perdas na criodessecação. As doses de FSH variam entre 60 e 1500, especialmente entre 75 e 225 UI por ampolla de liofilizado.

Qualquer gonadotropina usada está, preferencialmente, presente nas preparações liofilizadas, numa quantidade suficiente para formar uma concentração terapeuticamente útil de proteína após diluição, geralmente para administração parentérica (e.g. subcutânea ou intravenosa), com uma quantidade especificada de uma solução aquosa (e.g. água destilada para injeção ou solução salina normal estéril) para formar um volume de preparação contemplado para uso. Tal como aqui é usado, uma solução aquosa é uma solução contendo água como solvente primário, mas não necessariamente como o único solvente. Por exemplo, um recipiente com FSH pode conter 1 a 1000 microgramas (μg) de FSH (e.g. 75 unidades internacionais é considerada como sendo uma quantidade terapêutica). De preferência, estará presente no recipiente a maior quantidade possível, razoável, de proteína, uma vez que quanto maior é a quantidade de proteína presente geralmente mais estável é a preparação. As doses úteis de gonadotropinas são conhecidas dos clínicos, e a quantidade incluída numa dose depende geralmente do estado da doença e do paciente particular a ser tratado.

Por exemplo, têm sido administradas quantidades tão altas como 10 000 unidades internacionais e tão baixas como 15 unidades internacionais de HCG. Têm sido usadas injeções com 20 a 225 unidades internacionais de LH.

Numa concretização preferida, uma combinação de FSH e LH ou FSH e HCG é liofilizada juntamente para formar uma preparação com

quantidades terapêuticas de ambas as gonadotropinas seleccionadas.

B. Estabilizadores

Tal como é aqui usado, "estabilizar" é um termo relativo. Estabilizar com um agente ou composto estabilizador significa a capacidade para impedir ou retardar o decréscimo da actividade da proteína com o agente estabilizador. Por exemplo, uma preparação será considerada "estabilizada" se, com a adição de um composto de estabilização ("estabilizador"), levar mais tempo (e.g. 2 semanas em vez de 1 semana) a degradar-se a uma determinada temperatura, perdendo assim alguma da sua actividade in vivo ou in vitro em comparação com a preparação sem o estabilizador.

A actividade da proteína pode ser determinada por métodos conhecidos relacionados com a proteína particular. Uma medida de actividade pode ser feita medindo a quantidade de oligómeros (inactivos) formados ao longo do tempo. A formação de oligómeros numa amostra pode ser determinada por HPSEC.

Outros métodos para determinação da actividade residual de, por exemplo, NFSH incluem o ensaio da imunoactividade da enzima ("EIA") como descrito na Patente U.S., Republicação N.º. 32 696 de Schuurs et al; um conjunto disponível sob a designação comercial "FSHEIA" da bioMérieux de Marcy l'Etoile 69260 Charbonnières-les-Bains, França para FSH; e bioensaio in vitro de FSH e LH como descrito em Mannaerts et al, "Applications of in vitro Bioassays for Gonadotropins" Neuroendocrinology of Reproduction, pp. 49-58 (Elsevier Science Publishers bv, Amesterdão, NL 1987).

Os estabilizadores preferidos para usar com as preparações são os sais de ácidos dicarboxílicos tais como do ácido cítrico, ácido tartárico, ácido aspártico, e suas misturas. Os sais preferidos são os sais de sódio, potássio, lítio e amónio de tais ácidos dicarboxílicos, especialmente os sais de sódio e potássio. Outro sal de ácido dicarboxílico é o glutamato de sódio. A presença de um estabilizador de sal de ácido dicarboxílico actua no sentido de estabilizar as misturas enzimáticas, especialmente



a temperaturas relativamente elevadas durante períodos de tempo mais longos.

Quando são usados como estabilizadores, os sais de aspartato e glutamato originam uma melhor recuperação da actividade do que os sais de citrato, isocitrato ou tartarato.

Quando o sal de citrato é o estabilizador seleccionado, é preferida uma razão citrato/gonadotropina na gama de 200 a 400 (mg/mg), obtendo-se uma melhor estabilização e recuperação na presença de algum açúcar. Uma proteína especialmente preferida para usar com citrato de sódio é a NFSH, devido à capacidade do composto ser estabilizado com o estabilizador.

Preferem-se concentrações de estabilizadores de sal de ácido dicarboxílico suficientes para formarem uma solução com uma força iónica maior do que 0,050, em composições de FSH contendo entre 0,1 e 1000 µg de FSH. Especialmente preferidas são aquelas soluções com uma força iónica entre 0,250 e 0,350 que estabilizam geralmente, por exemplo, rFSH armazenada um mês a 60°C para se obter uma recuperação de 75% de rFSH. O cálculo da força iónica é bem conhecido dos peritos na arte, por exemplo, ver Chase, et al, Remington's Pharmaceutical Sciences, pp.223-224, 228 e 233 (16ª. edição 1980, Mack Publ. Co. de Easton, PA, U.S.A.).

Geralmente, concentrações em solução de 2,5 a 17,5 miligramas por mililitro (mg/ml) de citrato de sódio são suficientes para estabilizar rFSH liofilizada nas quantidades aqui referidas.

Tal como representado na FIG. 2, o citrato estará presente numa composição com, por exemplo, HCG numa quantidade 10 000 vezes inferior, em peso, à da HCG para atingir uma maior estabilidade.

C. Açúcares não redutores

As composições a serem secas contêm, de preferência, um açúcar não redutor, tal como a sacarose ou trealose. A incorpora-

ção de um tal açúcar, e.g. sacarose, actua no sentido de aumentar a "temperatura de colapso" (ou contracção) à qual a liofilização da solução acontece. Este aumento na temperatura simplifica todo o processo de criodessecação. Um açúcar não redutor especialmente preferido para esta utilização é a sacarose no seu estado amorfo.

A quantidade de açúcar não redutor presente na solução a ser liofilizada será, geralmente, dependente da quantidade de estabilizador de sal de ácido dicarboxílico presente. Por exemplo, a razão em peso do açúcar não redutor para sal de ácido dicarboxílico varia geralmente entre 50:1 e 10:3 sendo uma concentração preferida cerca de 3,3:1 no caso da sacarose/citrato de sódio. É especialmente preferida uma solução contendo 50 mg/ml de sacarose e 14,7 mg/ml de citrato de sódio que também origina um liofilizado óptimo em termos de características físicas.

Nas concretizações presentes mais preferidas, a quantidade de sacarose será suficiente para aumentar a temperatura de colapso de -38°C para cerca de -25°C como determinado por calorimetria diferencial de varrimento. O "bolo" liofilizado resultante permanece amorfo e estável durante períodos de tempo relativamente mais longos.

D. Agentes anti-adsorção

Os agentes anti-adsorção são preferencialmente adicionados à composição liofilizada para impedir a adsorção de proteína às paredes do recipiente onde as composições estão contidas, impedindo assim um possível decréscimo na concentração. Certos agentes anti-adsorção (e.g. polisorbatos) actuam, também, como "crioprotectores" protegendo a proteína durante o processo de liofilização.

Os agentes anti-adsorção preferidos são os surfactantes não-iónicos, tais como o Polisorbato 20, NF (Tween 20 disponível na Atlas Chemical Company), Polisorbato 80, NF (Tween 80 disponível na Atlas Chemical Company), Brij 35 (disponível na ICI Pharmaceuticals da Grã-Bretanha), e Pluronic F123 (disponível na BASF de Ludwigshafen, Alemanha). O polisorbato 20, NF é especialmente preferido.

Por polisorbato entenda-se, de preferência, um polisorbato que está de acordo com a especificação da USP/NF XXII, que é publicada como "The National Formulary", p. 1763 e 1967, Oficial a partir de 1 de Janeiro de 1990 (22ª. edição, U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 1989).

Um agente ou agentes anti-adsorção estarão presentes em quantidades tais que a adsorção da proteína nas paredes do recipiente, ou nas paredes dos vasos durante o processo, decresça. Ilustrativamente, são preferidas quantidades de Polisorbato 20 suficientes para formar uma concentração entre 0,1 e 0,2 mg/ml na solução final para utilização. Concentrações superiores a esta tendem a conduzir à formação de oligómeros, diminuindo assim a actividade.

E. Composições farmacêuticas

A preparação liofilizada estável do presente invento pode ser preparada por mistura da proteína seleccionada em solução aquosa, com uma quantidade suficiente de um estabilizador de sal de ácido dicarboxílico para estabilizar a proteína e com uma quantidade suficiente de um açúcar não redutor para aumentar a temperatura de colapso de -38°C para mais de -25°C . São preferidas temperaturas maiores do que -35°C . Opcionalmente, pode-se também adicionar o agente anti-adsorção seleccionado. A solução é, então, filtrada, colocada em recipientes (e.g. ampolas de vidro de 1 ml) e depois criodessecada para formar um liofilizado estabilizado. As técnicas de criodessecação são bem conhecidas daqueles peritos na arte. Para mais informações, pode ser feita referência a vários textos, incluindo Goldblith et al, Freeze Drying and Advanced Food Technology, (Academic Press, Inc., London, GB 1975). Os teores preferidos em água residual dos bolos liofilizados, estão entre 1 e 5%. Devem ser usadas técnicas assépticas durante todo o processo. Estão disponíveis criodessecadores em produtores, tais como Leybold ou Edwards. Usando um tal processo, ou suas modificações, podem ser preparadas várias composições diferentes.

Uma composição especialmente preferida contém rFSH misturada



com um estabilizador que é um sal de um ácido dicarboxílico, onde o ácido dicarboxílico é seleccionado de entre o grupo que consiste em ácido cítrico, ácido tartárico, ácido aspártico e misturas destes ácidos.

Outra preparação liofilizada preferida contém, em mistura, um estabilizador de sal de ácido dicarboxílico, uma gonadotropina capaz de ser estabilizada pela quantidade de estabilizador presente na preparação e trealose. Esta preparação inclui ainda, bifosfato de sódio misturado com o estabilizador, proteína e açúcar não redutor. Sais especialmente preferidos para tais preparações são o aspartato de sódio, o citrato de sódio e o tartarato de sódio.

Outra preparação liofilizada estável, preferida, contém, em mistura, um estabilizador, tal como um sal de ácido aspártico ou tartárico, uma gonadotropina capaz de ser estabilizada pela quantidade de estabilizador presente na preparação e um açúcar não redutor. A preparação pode ainda, incluir bifosfato de dissódio misturado com o estabilizador, proteína e açúcar não redutor. Os açúcares não redutores especialmente preferidos são a trealose e a sacarose. Um estabilizador especialmente preferido para estas preparações é o aspartato de sódio.

Outro liofilizado estabilizado altamente preferido consiste essencialmente de uma proteína; uma quantidade suficiente de um estabilizador de sal de ácido dicarboxílico para estabilizar a proteína na forma criodessecada; um açúcar não redutor dissacarídico; um agente anti-adsorção para impedir a adsorção da referida proteína no recipiente que contém o liofilizado; e menos do que cinco por cento de água residual. Neste liofilizado a proteína será a FSH; o estabilizador de sal de ácido dicarboxílico será seleccionado de entre o grupo que consiste em sais de ácido cítrico, de ácido tartárico e de ácido aspártico; o açúcar não redutor dissacarídico será sacarose ou a trealose e o agente anti-adsorção será seleccionado de entre o grupo que consiste em Tween 20, Tween 80, Brij, ou ácido plurónico. Este liofilizado é especialmente preferido uma vez que, entre outras coisas, se ve-

rificou que a adição de "estabilizadores" adicionais, tais como o manitol, a maltose ou ambos actua efectivamente no sentido da desestabilização do liofilizado em termos de actividade.

Os métodos para fazer preparações parentéricas e misturas intravenosas, são descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences, pp. 1463-1497. No entanto, tem que se proceder com cuidado uma vez que apesar de as composições estabilizadas serem compatíveis com os líquidos de infusão, o líquido de infusão utilizado preferencialmente não deverá conter açúcares redutores. O pH preferido da solução resultante para utilização deverá estar entre 6 e 8, especialmente 7.

O invento é explicado adicionalmente pelos EXEMPLOS seguintes:

EXEMPLO I

A. Estabilização da rFSH utilizando vários dissacáridos

Prepararam-se soluções aquosas contendo 150 unidades de rFSH. As soluções foram divididas em três grupos e cada grupo foi misturado com (1) 50 mg/ml de maltose/14,7 mg/ml de citrato de sódio; (2) 50 mg/ml de trealose/14,7 mg/ml de citrato de sódio e (3) 50 mg/ml de sacarose/14,7 mg/ml de citrato de sódio. As três soluções contêm, também, 0,2 mg/ml de Polisorbato 20, NF. Os três grupos de soluções foram criodessecados, e o liofilizado resultante foi deixado repousar durante quatro semanas a 60°C. Os liofilizados foram, depois, testados em relação à actividade (como determinado por EIA) e obtiveram-se os resultados seguintes:

Composto:	(1)	(2)	(3)
Percentagem de actividade:	40%	89%	87%

Este EXEMPLO mostra que os dissacáridos não redutores dão mais estabilidade que os dissacáridos redutores.

B. Estabilização da rFSH com citrato de sódio

Fizeram-se duas amostras liofilizadas. A primeira amostra contém 75 unidades de rFSH, 25 mg de sacarose amorfa, 7,35 mg de



citrato de sódio e 0,1 mg de Polisorbato (Tween) 20. A segunda amostra contém 75 unidades de rFSH, 25 mg de sacarose amorfa e 0,2 mg de Tween 20. O pH de ambas as amostras foi ajustado a 7. A primeira amostra foi armazenada durante 3 meses a 50°C, reconstituída com água purificada e analisada por HPSEC. O perfil resultante mostrou uma pequena formação de oligômero. A segunda amostra, a que não continha citrato de sódio, foi armazenada durante 6 meses a 50°C, reconstituída com água purificada, e analisada por HPSEC. O perfil resultante mostrou uma maior formação de oligômero.

O perfil da primeira amostra não mostrou qualquer degradação dos produtos enquanto que o perfil da segunda amostra mostrou quase exclusivamente produtos oligoméricos.

EXEMPLOS II-V

Outros estabilizadores de sal de ácido dicarboxílico

Tal como ilustrado na FIG. 1, fizeram-se amostras contendo rFSH e vários estabilizadores, liofilizaram-se e testaram-se quanto à actividade após 1 mês de armazenagem a 60°C. A FIG. 1 representa a correlação entre a força iónica ($\times 1\ 000$) do estabilizador particular e a percentagem de recuperação (como determinado por EIA).

Os estabilizadores testados foram o citrato de sódio, separadamente (II) e com 3,0 a 9,1 mg de Na_2HPO_4 por ampola (III); tartarato de sódio (IV); e aspartato de sódio (V). As concentrações foram determinadas em termos de força iónica como mostrado na FIG. 1.

EXEMPLO VI

Testou-se o efeito da razão em peso de citrato para a actividade da gonadotropina (HCG). Os resultados são mostrados na FIG. 2.

EXEMPLO VII

Fez-se uma composição liofilizada para FSH humana recombinante contendo 75 UI de rFSH, 14,7 mg de citrato de sódio, 50 mg

72 308

0/3518-593

-13-



de sacarose e 0,2 mg de polisorbato 20. A preparação foi reconstituída com um ml de água para injeção.

EXEMPLO VIII

Fez-se uma composição liofilizada para FSH humana recombinante contendo 75 UI de rFSH, 75 UI de LH, 15 mg de citrato de sódio, 50 mg de sacarose e 0,2 mg de polisorbato 20. A composição é estável. A preparação foi reconstituída com um ml de água para injeção.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo para produzir um liofilizado de gonadotropina estabilizado, caracterizado por compreender:

a mistura, em solução aquosa, de pelo menos uma gonadotropina com uma quantidade de sal de ácido dicarboxílico suficiente para ajustar a força iônica da referida solução entre 0,050 e 0,350,

a dissolução, na referida mistura, de um açúcar não redutor numa quantidade de cerca de três a cinquenta vezes a quantidade, em peso, do sal de ácido dicarboxílico, e

a criodessecação da referida mistura, a uma temperatura superior a -35° centígrados, para formar o referido liofilizado de gonadotropina estabilizado.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se adicionar também um surfactante não iônico.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a referida gonadotropina ser selecionada de entre o grupo formado por hormona luteinizante, gonadotropina coriônica humana, hormona estimuladora do folículo ou suas misturas.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o sal de ácido dicarboxílico ser um sal de ácido cítrico, tartárico ou aspártico.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o açúcar não redutor estar presente numa quantidade de três vezes a quantidade, em peso, do sal de ácido dicarboxílico.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por se adicionar uma segunda gonadotropina capaz de ser estabilizada pelo referido sal de ácido dicarboxílico.

72 308

0/3518-593

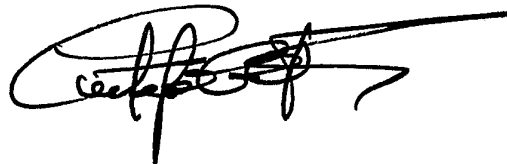
-15-

7 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o liofilizado conter uma parte em peso de uma gonadotropina; e 200 a 10 000 partes em peso de um estabilizador de sal de ácido dicarboxílico associado com a gonadotropina referida.

Lisboa, 19. MAR. 1991

Por AKZO N.V.

- O AGENTE OFICIAL -

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Carl...'. The signature is written over a horizontal line and includes a long, sweeping flourish that extends to the right.

CORRELAÇÃO ENTRE FORÇA IÔNICA E RECUPERAÇÃO (%)

(rFSH, 1 mês 60°C)

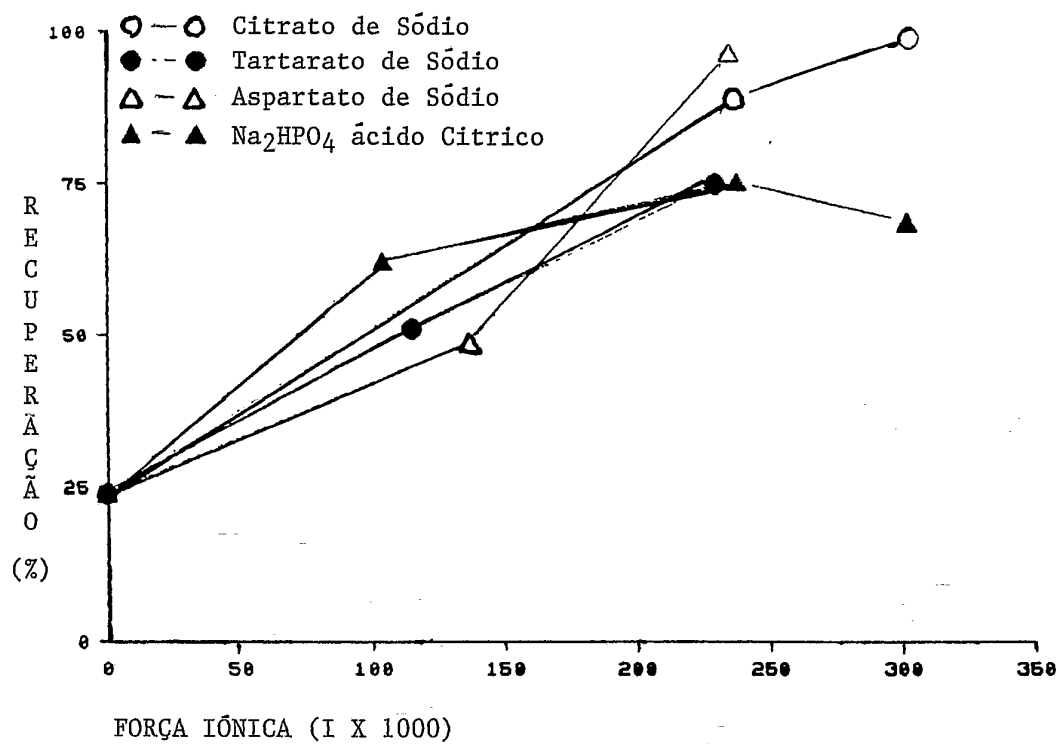


FIG.1

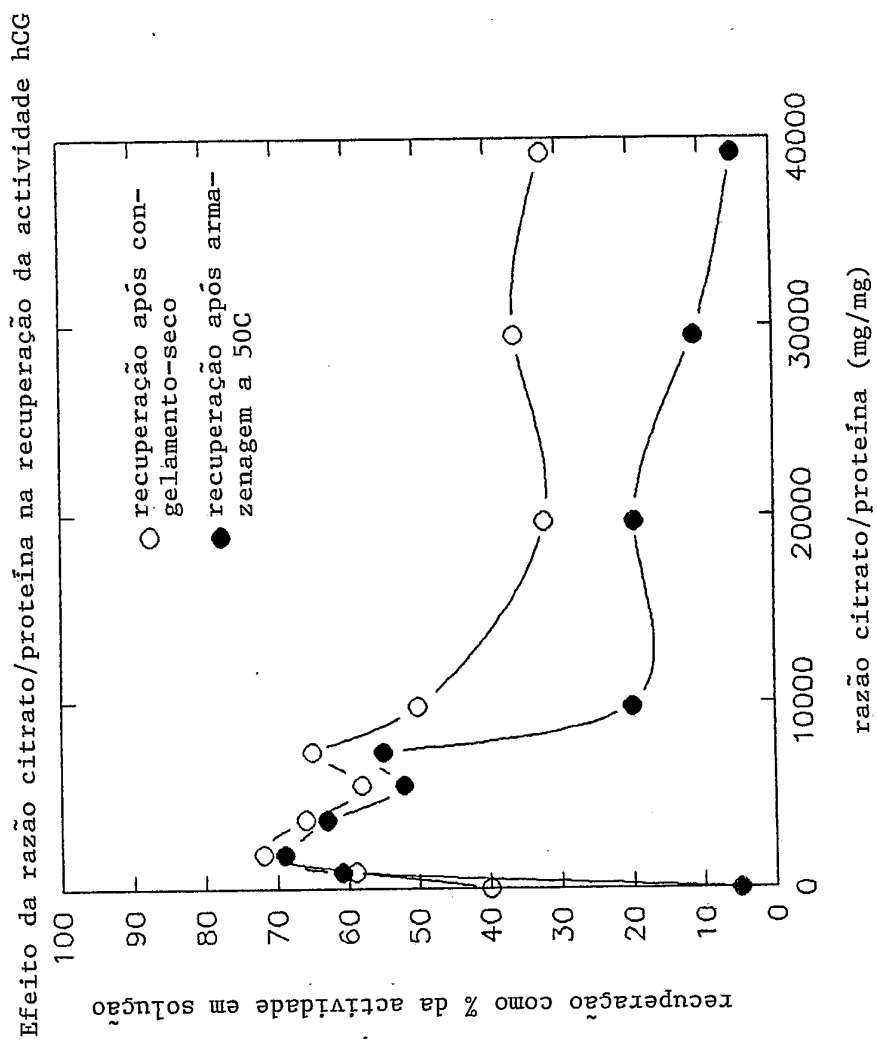


FIG.2