

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.04.02	(73) Titular(es): ARES TRADING S.A. ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ 1170 AUBONNE CH
(30) Prioridade(s): 2003.04.02 EP 03100882 2003.05.27 EP 03101543 2003.06.20 EP 03101828	(72) Inventor(es): FABRIZIO SAMARITANI IT PIERGIORGIO DONATI CH
(43) Data de publicação do pedido: 2006.01.04	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2010.12.22 003/2011	

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS OU LIOFILIZADAS DE FSH E/OU LH EM CONJUNTO COM O SURFACTANTE NÃO IÓNICO POLOXÂMERO 188 E UM AGENTE BACTERIOSTÁTICO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE AO DOMÍNIO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DE HORMONA ESTIMULANTE DO FOLÍCULO (FSH), HORMONA LUTEINIZANTE (LH) E MISTURAS DE FSH E HORMONA LUTEINIZANTE (LH), E A MÉTODOS DE PRODUÇÃO DESSAS FORMULAÇÕES. A INVENÇÃO PROPORCIONA UMA FORMULAÇÃO LÍQUIDA OU LIOFILIZADA DE FSH, OU LH, OU FSH E LH COMPREENDENDO UM SURFACTANTE SELECIONADO DE PLURONIC® F77, PLURONIC F87, PLURONIC F88 E PLURONIC F68.

RESUMO

"FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS OU LIOFILIZADAS DE FSH E/OU LH EM CONJUNTO COM O SURFACTANTE NÃO IÔNICO POLOXÂMERO 188 E UM AGENTE BACTERIOSTÁTICO"

A invenção refere-se ao domínio de formulações farmacêuticas de hormona estimulante do folículo (FSH), hormona luteinizante (LH) e misturas de FSH e hormona luteinizante (LH), e a métodos de produção dessas formulações. A invenção proporciona uma formulação líquida ou liofilizada de FSH, ou LH, ou FSH e LH compreendendo um surfactante seleccionado de Pluronic® F77, Pluronic F87, Pluronic F88 e Pluronic F68.

DESCRIÇÃO

"FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS OU LIOFILIZADAS DE FSH E/OU LH EM CONJUNTO COM O SURFACTANTE NÃO IÓNICO POLOXÂMERO 188 E UM AGENTE BACTERIOSTÁTICO"

Domínio da Invenção

A invenção refere-se ao domínio de formulações farmacêuticas de hormona estimulante do folículo (FSH), formulações de hormona luteinizante (LH), e misturas de FSH e hormona luteinizante (LH), bem como a métodos de produção dessas formulações.

Contexto da Invenção

A hormona estimulante do folículo (FSH), hormona luteinizante (LH) e gonadotrofina coriónica (CG) são proteínas injectáveis pertencentes à classe das gonadotrofinas. A FSH, LH e hCG são utilizadas isoladamente e em combinação no tratamento de infertilidade e perturbações do sistema reprodutor em pacientes do sexo feminino e masculino.

Na natureza, a FSH e LH são produzidas pela glândula pituitária. Para utilização farmacêutica, a FSH e LH e suas variantes podem ser produzidas de modo recombinante (rFSH e rLH), ou podem ser produzidas a partir da urina de mulheres na pós-menopausa (uFSH e uLH).

A FSH é utilizada em pacientes do sexo feminino na indução da ovulação (OI) e em hiperestimulação ovariana controlada (COH) para tecnologias de reprodução assistida (ART). Num regime de tratamento típico para indução da ovulação, um paciente recebe injeções diárias de FSH ou uma variante

(cerca de 75 até 300 IU de FSH/dia) durante um período desde cerca de 6 até cerca de 12 dias. Num regime de tratamento típico para hiperestimulação ovariana controlada, um paciente recebe injeções diárias de FSH ou uma variante (cerca de 150-600 IU de FSH/dia) durante um período desde cerca de 6 até cerca de 12 dias.

A FSH também é utilizada para induzir espermatogénese em homens que sofrem de oligospermia. Um regime utilizando 150 IU de FSH 3 vezes por semana em combinação com 2500 IU de hCG duas vezes por semana foi bem-sucedido na melhoria da contagem de espermatozóides em homens que sofrem de hipogonadismo hipogonadotrófico¹.

A LH é utilizada em pacientes do sexo feminino em combinação com a FSH em OI e em COH, particularmente naqueles pacientes com níveis muito baixos de LH endógena ou resistência muito baixa à LH, como mulheres que sofrem de hipogonadismo hipogonadotrófico (HH, grupo I da OMS) ou pacientes mais velhos (isto é, 35 anos ou mais), e pacientes nos quais a implantação de embriões ou abortos precoces constitui um problema. A LH em combinação com a FSH tem estado tradicionalmente disponível numa preparação denominada gonadotrofinas da menopausa humana (hMG) extraída da urina de mulheres na pós-menopausa. A hMG tem uma razão 1:1 de actividade de FSH:LH.

A CG actua no mesmo receptor da LH e induz as mesmas respostas. A CG tem um tempo de semivida na circulação mais longo do que a LH e, em consequência, é habitualmente utilizada como fonte de actuação prolongada de actividade de LH. A CG é utilizada em regimes OI e COH para imitar o pico natural da LH e desencadear a ovulação. Uma injeção

de gonadotrofina coriónica humana (hCG) é utilizada para desencadear a ovulação no final da estimulação com FSH ou uma mistura de FSH e LH. A CG também pode ser utilizada em conjunto com a FSH durante a estimulação para OI e COH, com a finalidade de proporcionar actividade de LH durante a estimulação em pacientes onde é desejável actividade de LH, como os mencionados acima.

A FSH, LH e CG são membros da família de hormonas glicoproteicas heterodiméricas que também inclui a hormona estimulante da tiróide (TSH). Os membros desta família são heterodímeros, compreendendo uma subunidade α e uma β . As subunidades mantêm-se unidas por interacções não covalentes. O heterodímero FSH humana (hFSH) consiste em (i) uma subunidade alfa glicoproteica madura com 92 aminoácidos, que também é comum aos outros membros da família humana (isto é, gonadotrofina coriónica ("CG"), hormona luteinizante ("LH") e hormona estimulante da tiróide ("TSH")), e (ii) uma subunidade beta madura com 111 aminoácidos que é única da FSH². O heterodímero LH humana consiste em (i) a subunidade alfa glicoproteica madura com 92 aminoácidos, e (ii) uma subunidade beta madura 112 que é única da LH³. As subunidades alfa e beta das glicoproteínas podem ser propensas a sofrer dissociação em formulações, devido à interacção com um conservante, surfactante e outros excipientes. A dissociação das subunidades conduz a perda de potência biológica⁴.

A FSH é formulada para injeção intramuscular (IM) ou subcutânea (SC). A FSH é fornecida em forma liofilizada (sólida) em frascos ou ampolas de 75 IU/frasco e 150 IU/frasco, com um tempo de vida por armazenamento de um ano e meio até dois anos quando armazenada a 2-25°C. Forma-se

uma solução para injeção por reconstituição do produto liofilizado com água para injeção (API). Para indução da ovulação ou hiperestimulação ovariana controlada são recomendadas injeções diárias com doses de partida de 75 IU até 600 IU durante um período até cerca de 10 dias. Dependendo da resposta do paciente podem ser usados até três ciclos de tratamento com doses crescentes de FSH. Com formulações liofilizadas é necessário que o paciente proceda à reconstituição de um novo frasco de material liofilizado com diluente e o administre imediatamente após a reconstituição numa base diária [Inserção da embalagem N1700101A, publicado em Fevereiro de 1996, para Fertinex™ (urofolitropina para injeção, purificada) para injeção subcutânea, pelo Serono Laboratories, Inc., Randolph, MA].

A FSH também foi formulada em formatos líquidos de uma única dose e múltiplas doses, em frascos ou ampolas. Os formatos de uma única dose devem permanecer estáveis e potentes por armazenamento antes da utilização. Os formatos de múltiplas doses não só devem permanecer estáveis e potentes por armazenamento antes da utilização mas também devem permanecer estáveis, potentes e relativamente desprovidos de bactérias durante o período de administração do regime de utilização de múltiplas doses, depois de a selagem da ampola ter sido comprometida. Por este motivo, os formatos de múltiplas doses contêm frequentemente um agente bacteriostático.

A LH é formulada para injeção intramuscular (IM) ou subcutânea (SC). A LH é fornecida em forma liofilizada (sólida) em frascos ou ampolas de 75 IU/frasco, com um tempo de vida por armazenamento de um ano e meio até dois anos quando armazenada a 2-25°C. Forma-se uma solução para

injecção por reconstituição do produto liofilizado com água para injecção (API). Para indução da ovulação ou hiperestimulação ovariana controlada, em conjunção com a FSH, são recomendadas injecções diárias com doses de partida de 75 IU até 600 IU durante um período até cerca de dez dias.

O documento EP 0 618 808 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) divulga uma composição farmacêutica compreendendo uma mistura íntima sólida de gonadotrofina e uma quantidade estabilizadora de sucrose isoladamente ou em combinação com glicina.

O documento EP 0 814 841 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) divulga uma composição farmacêutica líquida estável compreendendo gonadotrofina coriônica humana (hCG) recombinante e uma quantidade estabilizadora de manitol.

O documento EP 0 448 146 (AKZO N.V.) divulga um liofilizado contendo gonadotrofina estabilizada compreendendo uma parte por peso de uma gonadotrofina e 200 até 10 000 partes por peso de um estabilizador de sal de ácido dicarboxílico associado à gonadotrofina.

O documento EP 0 853 945 (Akzo Nobel N.V.) divulga uma formulação líquida contendo gonadotrofina caracterizada por a formulação compreender uma gonadotrofina e quantidades estabilizadoras de um ácido policarboxílico, ou respectivo sal, e de um composto tioéter.

O documento WO 00/04913 (Eli Lilly and Co.) divulga uma formulação compreendendo FSH, ou uma variante da FSH, contendo uma subunidade alfa e beta, e um conservante

seleccionado do grupo que consiste em fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, álcool benzílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo e afins), cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio, desidroacetato de sódio e timerosal, ou respectivas misturas, num diluente aquoso.

Continuam a ser necessárias formulações líquidas estáveis de FSH, ou variantes da FSH, e misturas de FSH e LH, para administração de uma única dose ou de múltiplas doses.

Resumo da invenção

Um objectivo da invenção consiste em proporcionar novas formulações liofilizadas e líquidas de FSH ou variantes da FSH, LH ou variantes da LH, proporcionar métodos para a sua preparação e métodos para a sua utilização farmacêutica ou veterinária no tratamento de perturbações de infertilidade.

Outro objectivo da invenção consiste em proporcionar novas formulações liofilizadas e líquidas de misturas de FSH e LH, proporcionar métodos para a sua preparação e métodos para a sua utilização farmacêutica ou veterinária no tratamento de perturbações de infertilidade.

Num primeiro aspecto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica liofilizada e líquida compreendendo FSH, ou respectiva variante, e o surfactante Pluronic F68.

Num segundo aspecto, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica líquida, que compreende formar uma solução de FSH, ou sua variante, e o surfactante Pluronic F68.

Num terceiro aspecto, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica embalada, que compreende distribuir num recipiente uma solução compreendendo FSH e o surfactante Pluronic F68.

Num quarto aspecto, a invenção proporciona um artigo preparado para utilização farmacêutica humana, que compreende um frasco compreendendo uma solução de FSH, ou uma variante da FSH, e o surfactante Pluronic F68, e um folheto declarando que essa solução pode ser mantida durante um período igual a ou cerca de vinte e quatro horas ou mais após a primeira utilização.

Num quinto aspecto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica liofilizada e líquida compreendendo FSH e LH e o surfactante Pluronic F68.

Num sexto aspecto, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica liofilizada e líquida, que compreende formar uma solução de FSH e LH e o surfactante Pluronic F68.

Num sétimo aspecto, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica embalada, que compreende distribuir num recipiente uma solução compreendendo FSH e LH e o surfactante Pluronic F68.

Num oitavo aspecto, a invenção proporciona um artigo preparado para utilização farmacêutica humana, que compreende um frasco compreendendo uma solução de FSH e LH e o surfactante Pluronic F68 e um folheto declarando que essa solução pode ser mantida durante um período igual a ou

cerca de vinte e quatro horas ou mais após a primeira utilização.

Num nono aspecto, a invenção proporciona um artigo preparado para utilização farmacêutica humana, que compreende um primeiro recipiente compreendendo FSH, ou uma variante da FSH, liofilizada e o surfactante Pluronic F68, e um segundo recipiente compreendendo um solvente para reconstituição, preferivelmente uma solução aquosa contendo um agente bacteriostático seleccionado de fenol e m-cresol, preferivelmente m-cresol.

Num décimo aspecto, a invenção proporciona um artigo preparado para utilização farmacêutica humana, que compreende um primeiro recipiente compreendendo LH, ou uma variante da LH, liofilizada e o surfactante Pluronic F68, e um segundo recipiente compreendendo um solvente para reconstituição, preferivelmente uma solução aquosa contendo um agente bacteriostático seleccionado de fenol e m-cresol, preferivelmente m-cresol.

Num décimo primeiro aspecto, a invenção proporciona um artigo preparado para utilização farmacêutica humana, que compreende um primeiro recipiente compreendendo FSH bem como LH, ou uma variante da FSH ou LH, liofilizada e o surfactante Pluronic F68, e um segundo recipiente compreendendo um solvente para reconstituição, preferivelmente uma solução aquosa com m-cresol.

Descrição pormenorizada da invenção

Descrição breve das figuras

A Figura 1 ilustra a percentagem de subunidade α oxidada em formulações de FSH contendo Pluronic F68, metionina a 10

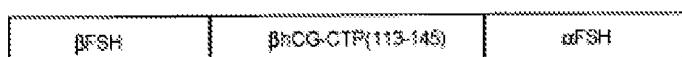
$\mu\text{g/mL}$ ("Met 10 mcg/mL") e $100 \mu\text{g/mL}$ ("Met 100 mcg/mL") versus uma formulação sem metionina ("Sem metionina"), nos instantes 0, 1 semana e 2 semanas.

As formulações líquidas e liofilizadas de FSH ou FSH e LH da invenção têm propriedades melhoradas ou mais adequadas de estabilidade e são úteis para o tratamento de infertilidade em mulheres e/ou homens. Estas formulações e artigos preparados são adicionalmente adequados para utilização em sistemas de distribuição injectáveis e alternativos, por exemplo mas não se limitando a libertação prolongada nasal, pulmonar, transmucosa, transdérmica, oral, subcutânea, intramuscular ou parentérica. Numa forma de realização particularmente preferida, as formulações da invenção destinam-se a injeção subcutânea e/ou intramuscular. As soluções e formulações proporcionadas de variantes de FSH ou FSH e LH também podem exibir potência *in vivo* aumentada ao longo do tempo em comparação com produtos comerciais conhecidos, ao prevenir ou reduzir perda da actividade ou estabilidade, ou ao melhorar qualquer aspecto da eficácia ou modo desejável da administração, por exemplo, por pelo menos um de entre modo, frequência, dosagem, conforto, facilidade de utilização, actividade biológica *in vitro* ou *in vivo*, e afins.

Hormona estimulante do folículo, ou FSH, tal como é usado aqui, refere-se à FSH produzida na forma de uma proteína madura completa, que inclui mas não está limitada a FSH humana ou "hFSH", produzida de modo recombinante ou isolada de fontes humanas, como a urina de mulheres na pós-menopausa. A sequência proteica da subunidade alfa da glicoproteína humana está apresentada na SEQ ID NO: 1, e a

sequência proteica da subunidade beta da FSH humana está apresentada na SEQ ID NO: 2.

Pretende-se que a expressão "variante da FSH" abranja aquelas moléculas que diferem da FSH humana quanto à sequência de aminoácidos, padrão de glicosilação ou na ligação inter-subunidades mas que exibem actividade de FSH. Exemplos incluem CTP-FSH, uma FSH recombinante modificada de actuação prolongada, que consiste na subunidade α de tipo selvagem e uma subunidade β híbrida na qual o péptido do terminal carboxi da hCG foi fundido ao terminal C da subunidade β da FSH, como descrito em LaPolt et al.; *Endocrinology*; 1992, 131, 2514-2520, ou Klein et al.; "Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist"; *Human Reprod.* 2003, 18, 50-56]. Também está incluída CTP-FSH de cadeia simples, uma molécula de uma única cadeia que consiste nas sequências seguintes (do terminal N para o terminal C):



em que β FSH significa a subunidade β da FSH, β hCG CTP (113-145) significa o péptido do terminal carboxi da hCG e α FSH significa a subunidade α da FSH, como descrito por Klein et al.⁵ Outros exemplos de variantes da FSH incluem moléculas de FSH com sítios de glicosilação adicionais incorporados na subunidade α e/ou β , como divulgado em WO 01/58493 (Maxygen), particularmente como divulgado nas reivindicações 10 e 11 de WO 01/58493, e moléculas de FSH com ligações S-S inter-subunidades, como divulgado em WO 98/58957.

As variantes da FSH referidas aqui também incluem as deleções no terminal carboxi da subunidade beta que são mais pequenas do que a proteína madura completa da SEQ ID NO: 2. Deleções no terminal carboxi da subunidade beta humana são apresentadas nas SEQ ID NOS: 3, 4 e 5. É entendido que as variantes no terminal carboxi da cadeia beta formam dímeros com uma subunidade alfa conhecida para formar um heterodímero variante da FSH.

Heterodímeros da FSH ou heterodímeros de variantes da FSH podem ser produzidos por qualquer método adequado, tal como de modo recombinante, por isolamento ou purificação de fontes naturais, consoante o caso, ou por síntese química, ou qualquer combinação destes.

A utilização do termo "recombinante" refere-se a preparações de variantes de FSH, LH ou FSH e LH que são produzidas utilizando tecnologia de DNA recombinante (ver, por exemplo, WO 85/01958). As sequências de clones genómicos e de cDNA da FSH são conhecidas para as subunidades alfa e beta de várias espécies⁶. Um exemplo de um método de expressão de FSH ou LH utilizando tecnologia recombinante é por transfecção de células eucarióticas com as sequências de DNA que codificam uma subunidade alfa e beta da FSH ou LH, proporcionadas num vector ou em dois vectores em que cada subunidade tem um promotor separado, como descrito nas patentes europeias n.ºs EP 0 211 894 e EP 0 487 512. Outro exemplo da utilização de tecnologia recombinante para produzir FSH ou LH consiste em utilizar recombinação homóloga para inserir um segmento regulador heterólogo em conexão operativa com sequências endógenas que codificam as subunidades da FSH ou LH, como descrito na

patente europeia n° EP 0 505 500 (Applied Research Systems ARS Holding NV).

A FSH ou variante da FSH utilizada de acordo com a presente invenção pode ser produzida não só por meios recombinantes, incluindo a partir de células de mamífero, mas também pode ser purificada de outras fontes biológicas, como de fontes urinárias. Metodologias aceitáveis incluem as descritas em 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, e Valove, et al., *Endocrinology*, 135: 2657-2661, 1994, Patente U.S. 3,119,740 e Patente US n° 5,767,067.

Hormona luteinizante, ou LH, tal como é usado aqui, refere-se à LH produzida na forma de uma proteína madura completa, que inclui mas não está limitada à LH humana ou "hLH", produzida de modo recombinante ou isolada de fontes humanas, como a urina de mulheres na pós-menopausa. A sequência proteica da subunidade alfa da glicoproteína humana está apresentada na SEQ ID NO: 1, e a sequência proteica da subunidade beta da LH humana⁷ está apresentada na SEQ ID NO: 6. Numa forma de realização preferida, a LH é recombinante.

Pretende-se que a expressão "variante da LH" abranja aquelas moléculas que diferem da LH humana quanto à sequência de aminoácidos, padrão de glicosilação ou ligação inter-subunidades mas que exibem actividade de LH humana.

Heterodímeros de LH ou heterodímeros de variantes de LH podem ser produzidos por qualquer método adequado, tal como de modo recombinante, por isolamento ou purificação de fontes naturais, consoante o caso, ou por síntese química, ou qualquer combinação destes.

O termo "administrar" significa introduzir uma formulação da presente invenção no corpo de um paciente necessitado, para tratar uma doença ou estado.

O termo "paciente" significa um mamífero que é tratado quanto a uma doença ou estado. Pacientes têm mas não se limitam às origens seguintes: humana, ovina, porcina, equina, bovina, coelhos e afins.

O termo "potência" relacionado com a actividade de FSH refere-se à capacidade de uma formulação de FSH ou de uma formulação mista para induzir respostas biológicas associadas à FSH, como o ganho de peso ovariano no ensaio de Steelman-Pohley⁸, ou crescimento folicular num paciente do sexo feminino. O crescimento folicular num paciente do sexo feminino pode ser avaliado por ultra-sons, por exemplo, em termos do número de folículos com um diâmetro médio igual a ou cerca de 16 mm no dia 8 da estimulação. A actividade biológica é avaliada relativamente a um padrão aceite para a FSH.

O termo "potência" relacionado com a actividade de LH refere-se à capacidade de uma formulação de LH ou de uma formulação mista para induzir respostas biológicas associadas à LH, como o método de ganho de peso de vesículas seminais.⁹ A actividade biológica da LH é avaliada relativamente a um padrão aceite para a LH.

O termo "diluyente aquoso" refere-se a um solvente líquido que contém água. Sistemas solventes aquosos podem consistir apenas em água, ou podem consistir em água mais um ou mais solventes miscíveis, e podem conter solutos dissolvidos, como açúcares, tampões, sais ou outros excipientes. Os solventes não aquosos mais habitualmente utilizados são os álcoois orgânicos de cadeia curta, como metanol, etanol, propanol, cetonas de cadeia curta, como acetona, e poliálcoois, como glicerol.

Um "agente de isotonicidade" é um composto que é fisiologicamente tolerado e que confere uma tonicidade adequada a uma formulação para evitar o fluxo líquido de água através de membranas celulares que estão em contacto com a formulação. Compostos como glicerina são habitualmente utilizados para essas finalidades em concentrações conhecidas. Outros agentes de isotonicidade adequados incluem mas não se limitam a aminoácidos ou proteínas (por exemplo, glicina ou albumina), sais (por exemplo, cloreto de sódio) e açúcares (por exemplo, dextrose, sucrose e lactose).

O termo "bacteriostático" ou "agente bacteriostático" refere-se a um composto ou composições adicionados a uma formulação para actuarem como agentes antibacterianos. Uma formulação conservada contendo FSH ou variante da FSH ou FSH e LH da presente invenção preferivelmente cumpre directrizes legais ou regulamentares quanto à eficácia da conservação de modo a ser um produto de múltiplos usos comercialmente viável, preferivelmente em humanos. Exemplos de bacteriostáticos incluem fenol, *m*-cresol, *p*-cresol, *o*-cresol, clorocresol, álcool benzílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo e afins), cloreto de

benzalcônio, cloreto de benzetônio, desidroacetato de sódio e timerosal, em que fenol e m-cresol são os agentes bacteriostáticos utilizados na presente invenção.

O termo "tampão" ou "tampão fisiologicamente aceitável" refere-se a soluções de compostos que se sabe serem seguras para utilização farmacêutica ou veterinária em formulações e que têm o efeito de manter ou controlar o pH da formulação na gama de pH desejada para a formulação. Tampões aceitáveis para controlar o pH a um pH moderadamente ácido até um pH moderadamente básico incluem mas não se limitam a compostos tais como fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina. "TRIS" refere-se a 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol, e a qualquer seu sal farmacologicamente aceitável. Tampões preferíveis são tampões de fosfato com solução salina ou um sal aceitável.

O termo "tampão de fosfato" refere-se a soluções contendo ácido fosfórico ou seus sais, ajustadas para um pH desejado. Em geral, os tampões de fosfato são preparados a partir de ácido fosfórico, ou um sal do ácido fosfórico, incluindo mas não se limitando aos sais de sódio e potássio. São conhecidos na área vários sais do ácido fosfórico, como sais monobásicos, dibásicos e tribásicos de sódio e potássio do ácido. Também é conhecido que sais do ácido fosfórico ocorrem na forma de hidratos do sal ocorrente. Tampões de fosfato podem abranger uma gama de pHs, como desde cerca de pH 4 até cerca de pH 10, e gamas preferidas desde cerca de pH 5 até cerca de pH 9, e uma gama muito preferida igual a ou cerca de 6,0 até igual a ou cerca de 8,0, muito preferivelmente igual a ou cerca de pH 7,0.

O termo "frasco" refere-se de modo lato a um reservatório adequado para reter FSH em forma sólida ou líquida num estado esterilizado contido. Exemplos de um frasco, como usado aqui, incluem ampolas, cartuchos, embalagens alveolares, ou outro reservatório afim adequado para distribuição da FSH no paciente via uma seringa, bomba (incluindo osmótica), cateter, emplastro transdérmico, pulverização pulmonar ou transmucosa. Frascos adequados para o embalamento de produtos para administração parentérica, pulmonar, transmucosa ou transdérmica são bem conhecidos e são reconhecidos na área.

O termo "estabilidade" refere-se à estabilidade física, química e conformacional da FSH e LH nas formulações da presente invenção (incluindo manutenção da potência biológica). A instabilidade de uma formulação proteica pode ser causada por degradação química ou agregação das moléculas proteicas que formam polímeros de ordem maior, por dissociação dos heterodímeros em monómeros, desglicosilação, modificação da glicosilação, oxidação (particularmente da subunidade α), ou qualquer outra modificação estrutural que reduza pelo menos uma actividade biológica de um polipéptido da FSH incluído na presente invenção.

Uma solução ou formulação "estável" é tal que o grau de degradação, modificação, agregação, perda da actividade biológica e afins de proteínas aí presentes está controlado de modo aceitável e não aumenta de modo inaceitável com o tempo. Preferivelmente, a formulação retém pelo menos igual a ou cerca de 80% da actividade de FSH etiquetada e pelo menos igual a ou cerca de 80% da actividade de LH etiquetada durante um período de 6 meses a uma temperatura

igual a ou cerca de 2-8°C, mais preferivelmente igual a ou cerca de 2-8°C, mais preferivelmente igual a ou cerca de 4-5°C. A actividade de FSH pode ser medida usando o bioensaio de ganho de peso ovariano de Steelman-Pohley⁵. A actividade de LH pode ser medida usando o bioensaio de ganho de peso de vesículas seminiais¹⁰.

O termo "tratamento" refere-se à administração, seguimento, gestão e/ou prestação de cuidados de um paciente para o qual é desejável a administração de FSH e/ou LH, com a finalidade de conferir estimulação do folículo ou testicular ou qualquer outra resposta fisiológica regulada pela FSH e/ou LH. Assim, o tratamento pode incluir mas não se limita à administração de FSH e/ou LH para a indução ou melhoria da qualidade do esperma, estimulação da libertação de testosterona no homem, ou desenvolvimento folicular ou para indução da ovulação na mulher.

Pretende-se que a expressão "utilização de múltiplas doses" inclua a utilização de um único frasco, ampola ou cartucho de uma formulação de FSH ou de uma formulação de FSH e LH para mais do que uma injeção, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais injeções. As injeções são preferivelmente aplicadas num período de pelo menos ou cerca de 12 horas, 24 horas, 48 horas, etc., preferivelmente até um período de ou cerca de 12 dias. As injeções podem ser espaçadas no tempo, por exemplo, por um período de 6, 12, 24, 48 ou 72 horas.

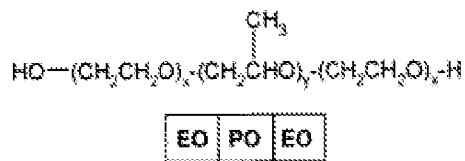
Um "sal" de uma proteína é um sal de adição de ácido ou base. Esses sais são preferivelmente formados entre qualquer um ou mais dos grupos com carga presentes na proteína e qualquer um ou mais catiões ou aniões não

tóxicos fisiologicamente aceitáveis. Sais orgânicos e inorgânicos incluem, por exemplo, os preparados a partir de ácidos como clorídrico, sulfúrico, sulfônico, tartárico, fumárico, bromídrico, glicólico, cítrico, maleico, fosfórico, succínico, acético, nítrico, benzóico, ascórbico, p-toluenossulfônico, benzenossulfônico, naftalenossulfônico, propiônico, carbônico e afins, ou, por exemplo, de amônio, sódio, potássio, cálcio ou magnésio.

Os inventores descobriram que, ao formular FSH e misturas de FSH e LH com o surfactante Pluronic® F68 (BASF, o Pluronic F68 também é conhecido como Poloxâmero 188), obtêm formulações estáveis que minimizam a perda do princípio activo (FSH ou FSH e LH) causada por adsorção nas superfícies do frasco e/ou dispositivo de distribuição (por exemplo, seringa, bomba, cateter, etc.).

Os inventores também descobriram que, ao formular FSH e misturas de FSH e LH com o surfactante Pluronic® F68 (BASF, o Pluronic F68 também é conhecido como Poloxâmero 188), obtêm uma formulação estável que evita o problema de precipitação na presença de um agente bacteriostático, como m-cresol e fenol. Ocorre precipitação, dando origem à formação de soluções turvas ou leitosas, quando TWEEN 20 é utilizado com m-cresol ou fenol.

Os surfactantes Pluronic são copolímeros de bloco de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO). O bloco de óxido de propileno (PO) é ensanduichado entre dois blocos de óxido de etileno (EO).



Os surfactantes Pluronic são sintetizados num processo em dois passos:

1. Um hidrófobo com o peso molecular desejado é criado pela adição controlada de óxido de propileno aos dois grupos hidroxilo do propilenoglicol, e
2. Óxido de etileno é adicionado para ensanduichar o hidrófobo entre grupos hidrófilos.

No Pluronic® F77, a percentagem de polioxietileno (hidrófilo) é 70% e o peso molecular do hidrófobo (polioxipropileno) é aproximadamente 2 306 Da.

No Pluronic F87, a percentagem de polioxietileno (hidrófilo) é 70% e o peso molecular do hidrófobo (polioxipropileno) é aproximadamente 2 644 Da.

No Pluronic F88, a percentagem de polioxietileno (hidrófilo) é 80% e o peso molecular do hidrófobo (polioxipropileno) é aproximadamente 2 644 Da.

No Pluronic F68, a percentagem de polioxietileno (hidrófilo) é 80% e o peso molecular do hidrófobo (polioxipropileno) é aproximadamente 1 967 Da.

Listam-se abaixo propriedades típicas do Pluronic F77:

Peso Molecular Médio: 6600;

Ponto de fusão/escoamento: 48°C;

Forma Física @ 20°C: sólido;

Viscosidade (Brookfield) cps: 480 [líquidos a 25°C, pastas a 60°C e sólidos a 77°C];

Tensão superficial, dynes/cm @ 25°C;

0,1% Conc.: 47,0

0,01% Conc.: 49,3

0,001% Conc.: 52,8

Tensão na interface, dynes/cm @ 25°C versus Nujol;

0,1% Conc.: 17,7

0,01% Conc.: 20,8

0,01% Conc.: 25,5

Humedecimento de Draves, Segundos 25°C

1,0% Conc.: > 360

0,1% Conc.: > 360

Altura da Espuma

Ross Miles, 0,1%, mm @ 50°C: 100

Ross Miles, 0,1%, mm @ 26°C: 47

Dinâmica, 0,1%, mm @ 400 mL/minuto: > 600

Ponto de turvação em solução aquosa, °C

1% Conc.: > 100

10% Conc.: > 100

HLB (equilíbrio hidrófilo-lipófilo): 25

Listam-se abaixo propriedades típicas do Pluronic F87:

Peso Molecular Médio: 7700;

Ponto de fusão/escoamento: 49°C;

Forma Física @ 20°C: sólido;

Viscosidade (Brookfield) cps: 700 [líquidos a 25°C, pastas a 60°C e sólidos a 77°C];

Tensão superficial, dynes/cm @ 25°C:

0,1% Conc.: 44,0

0,01% Conc.: 47,0

0,001% Conc.: 50,2

Tensão na interface, dynes/cm @ 25°C versus Nujol;

0,1% Conc.: 17,4

0,01% Conc.: 20,3

0,01% Conc.: 23,3

Humedecimento de Draves, Segundos 25°C

1,0% Conc.: > 360

0,1% Conc.: > 360

Altura da Espuma

Ross Miles, 0,1%, mm @ 50°C: 80

Ross Miles, 0,1%, mm @ 26°C: 37

Dinâmica, 0,1%, mm @ 400 mL/minuto: > 600

Ponto de turvação em solução aquosa, °C

1% Conc.: > 100

10% Conc.: > 100

HLB (equilíbrio hidrófilo-lipófilo): 24

Listam-se abaixo propriedades típicas do Pluronic F88:

Peso Molecular Médio: 11400;

Ponto de fusão/escoamento: 54°C;

Forma Física @ 20°C: sólido;

Viscosidade (Brookfield) cps: 2300 [líquidos a 25°C, pastas a 60°C e sólidos a 77°C];

Tensão superficial, dynes/cm @ 25°C;

0,1% Conc.: 48,5

0,01% Conc.: 52,6

0,001% Conc.: 55,7

Tensão na interface, dynes/cm @ 25°C versus Nujol;

0,1% Conc.: 20,5

0,01% Conc.: 23,3

0,01% Conc.: 27,0
 Humedecimento de Draves, Segundos 25°C
 1,0% Conc.: > 360
 0,1% Conc.: > 360
 Altura da Espuma
 Ross Miles, 0,1%, mm @ 50°C: 80
 Ross Miles, 0,1%, mm @ 26°C: 37
 Dinâmica, 0,1%, mm @ 400 mL/minuto: > 600
 Ponto de turvação em solução aquosa, °C
 1% Conc.: > 100
 10% Conc.: > 100
 HLB (equilíbrio hidrófilo-lipófilo): 28

Listam-se abaixo propriedades típicas do Pluronic F68:

Peso Molecular Médio: 8400;
 Ponto de fusão/escoamento: 52°C;
 Forma Física @ 20°C: sólido;
 Viscosidade (Brookfield) cps: 1000 [líquidos a 25°C, pastas a 60°C e sólidos a 77°C];
 Tensão superficial, dynes/cm @ 25°C;
 0,1% Conc.: 50,3
 0,01% Conc.: 51,2
 0,001% Conc.: 53,6
 Tensão na interface, dynes/cm @ 25°C versus Nujol;
 0,1% Conc.: 19,8
 0,01% Conc.: 24,0
 0,01% Conc.: 26,0
 Humedecimento de Draves, Segundos 25°C
 1,0% Conc.: > 360
 0,1% Conc.: > 360
 Altura da Espuma
 Ross Miles, 0,1%, mm @ 50°C: 35

Ross Miles, 0,1%, mm @ 26°C: 40

Dinâmica, 0,1%, mm @ 400 mL/minuto: > 600

Ponto de turvação em solução aquosa, °C

1% Conc.: > 100

10% Conc.: > 100

HLB (equilíbrio hidrófilo-lipófilo): 29

O Pluronic F68 está presente na formulação numa concentração que é suficiente para manter a estabilidade da FSH e/ou LH durante o período de armazenamento desejado (por exemplo, 6 até 12 até 24 meses), e também numa concentração que é suficiente para evitar perdas proteicas devido a adsorção em superfícies, como do frasco, ampola ou cartucho ou a seringa.

Preferivelmente, a concentração de Pluronic F68 em formulações líquidas é igual a ou cerca de 0,01 mg/mL até igual a ou cerca de 1 mg/mL, mais preferivelmente igual a ou cerca de 0,05 mg/mL até igual a ou cerca de 0,5 mg/mL, em particular mais preferivelmente igual a ou cerca de 0,2 mg/mL até igual a ou cerca de 0,4 mg/mL, muito preferivelmente igual a ou cerca de 0,1 mg/mL.

A hormona estimulante do folículo (FSH) na formulação liofilizada está preferivelmente presente numa concentração (p/p) igual a ou cerca de 0,1 até 10 µg/mg da formulação total. Numa forma de realização, a hormona estimulante do folículo (FSH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 0,3 até 5 µg/mg da formulação total. Noutra forma de realização, a hormona estimulante do folículo (FSH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 0,37 até 2 µg/mg da formulação total.

A hormona luteinizante (LH) na formulação liofilizada está preferivelmente presente numa concentração igual a ou cerca de 0,1 até 3 µg/mg da formulação total. Numa forma de realização, a hormona luteinizante (LH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 0,1 até 1 µg/mg da formulação total. Noutra forma de realização, a hormona luteinizante (LH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 0,1 até 0,6 µg/mg da formulação total.

Nas formulações líquidas - incluindo as formulações reconstituídas - compreendendo FSH, preferivelmente a concentração de FSH na formulação é igual a ou cerca de 150 IU/mL até igual a ou cerca de 2 000 IU/mL, mais preferivelmente igual a ou cerca de 300 IU/mL até igual a ou cerca de 1 500 IU/mL, em particular mais preferivelmente igual a ou cerca de 450 até igual a ou cerca de 750, muito preferivelmente igual a ou cerca de 600 IU/mL.

Nas formulações líquidas - incluindo as formulações reconstituídas - compreendendo LH, preferivelmente a concentração de LH na formulação é igual a ou cerca de 50 IU/mL até igual a ou cerca de 2 000 IU/mL, mais preferivelmente igual a ou cerca de 150 até igual a ou cerca de 1 500 IU/mL, em particular mais preferivelmente igual a ou cerca de 300 IU/mL até igual a ou cerca de 750 IU/mL, em particular preferivelmente 625 IU/mL.

Em formulações compreendendo FSH e LH, a razão entre FSH e LH (FSH:LH, IU:IU, FSH medida com o ensaio de ganho de peso ovariano do rato e LH medida com o ensaio de ganho de peso de vesículas seminais do rato) situa-se preferivelmente no intervalo igual a ou cerca de 6:1 até igual a ou cerca de 1:6, mais preferivelmente igual a ou cerca de 4:1 até igual

a ou cerca de 1:2, em particular mais preferivelmente igual a ou cerca de 3:1 até igual a ou cerca de 1:1. Razões particularmente preferidas são 1:1 e 2:1.

Nas formulações liofilizadas, o surfactante Pluronic F 68 está preferivelmente presente numa concentração igual a ou cerca de 0,001 até igual a ou cerca de 0,1 mg por mg da formulação total, mais preferivelmente igual a ou cerca de 0,01 até igual a ou cerca de 0,075 mg/mg.

Preferivelmente, a concentração de Pluronic F68 nas formulações reconstituídas é igual a ou cerca de 0,01 mg/mL até igual a ou cerca de 1 mg/mL, mais preferivelmente igual a ou cerca de 0,05 mg/mL até igual a ou cerca de 0,5 mg/mL, em particular mais preferivelmente igual a ou cerca de 0,2 mg/mL até igual a ou cerca de 0,4 mg/mL, muito preferivelmente igual a ou cerca de 0,1 mg/mL.

Preferivelmente, a FSH e LH são produzidas de modo recombinante, em particular são preferivelmente produzidas em células de ovário de hamster chinês transfectadas com um vector ou vectores compreendendo DNA que codifica para a subunidade alfa e a subunidade beta glicoproteicas humanas da FSH ou LH. O DNA que codifica as subunidades alfa e beta pode estar presente no mesmo vector ou em vectores diferentes.

A FSH e LH recombinantes têm várias vantagens relativamente aos seus correspondentes urinários. Técnicas de cultura e isolamento utilizando células recombinantes permitem obter consistência entre lotes. Em contraste, a FSH e LH urinárias variam muito de lote para lote no que se refere a características tais como pureza, padrão de glicosilação,

sialilação e oxidação das subunidades. Devido à maior consistência e pureza lote-para-lote da FSH e LH recombinantes, as hormonas podem ser facilmente identificadas e quantificadas utilizando técnicas tais como focagem isoeléctrica (IEF). A facilidade da identificação e quantificação da FSH e LH recombinantes permite o enchimento dos frascos por massa de hormona (enchimento-pela-massa) em vez do enchimento por bioensaio.

Preferivelmente, formulações de FSH da presente invenção têm pH igual a ou cerca de 6,0 até igual a ou cerca de 8,0, mais preferivelmente igual a ou cerca de 6,8 até igual a ou cerca de 7,8, incluindo cerca de pH 7,0, pH 7,2 e 7,4. Um tampão preferido é fosfato, e contra-íões preferidos são íões sódio ou potássio. Tampões de solução salina com fosfato são bem conhecidos na área, como solução salina tamponada com Fosfato de Dulbecco. As concentrações de tampão na solução total podem variar entre igual a ou cerca de 5 mM, 9,5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM e 500 mM. Preferivelmente, a concentração do tampão é igual a ou cerca de 10 mM. É particularmente preferido um tampão 10 mM em íões fosfato com um pH de 7,0.

Preferivelmente, formulações ou misturas de FSH e LH da presente invenção têm pH igual a ou cerca de 6,0 até igual a ou cerca de 9,0, mais preferivelmente igual a ou cerca de 6,8 até igual a ou cerca de 8,5, incluindo cerca de pH 7,0, pH 8,0 e 8,2, muito preferivelmente igual a ou cerca de pH 8,0.

A invenção é dirigida a formulações líquidas, bem como formulações liofilizadas que podem ser reconstituídas, nas quais o solvente (também para reconstituição) é água para injecção. Formulações líquidas podem ser de dose única ou

de múltiplas doses. As formulações líquidas e liofilizadas de FSH e/ou LH da invenção destinadas a utilização de múltiplas doses compreendem um bacteriostático seleccionado de fenol e *m*-cresol. O mais preferido é *m*-cresol. O agente bacteriostático é utilizado numa quantidade que originará uma concentração que é eficaz para manter a formulação essencialmente desprovida de bactérias (adequada para injeccão) durante o período de injeccão de múltiplas doses, que pode ser igual a ou cerca de 12 ou 24 horas até igual a ou cerca de 12 ou 14 dias, preferivelmente igual a ou cerca de 6 até igual a ou cerca de 12 dias. O bacteriostático está preferivelmente presente numa concentração igual a ou cerca de 0,1% (massa do bacteriostático/massa do solvente) até igual a ou cerca de 2,0%, mais preferivelmente igual a ou cerca de 0,2% até igual a ou cerca de 1,0%. No caso do fenol, é particularmente preferida igual a ou cerca de 0,5%. No caso do *m*-cresol, é particularmente preferida uma concentração igual a ou cerca de 0,3% (por exemplo, igual a ou cerca de 3 mg/mL em API).

Numa forma de realização preferida, a invenção proporciona uma composição farmacêutica líquida, preferivelmente para utilização de múltiplas doses, compreendendo FSH ou uma sua variante, o surfactante Pluronic F68 e um bacteriostático seleccionado de *m*-cresol e fenol, preferivelmente *m*-cresol.

Noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona uma composição farmacêutica líquida, preferivelmente para utilização de múltiplas doses, compreendendo LH, o surfactante Pluronic F68 e um bacteriostático seleccionado de *m*-cresol e fenol, preferivelmente *m*-cresol.

Noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona uma composição farmacêutica líquida, preferivelmente para utilização de múltiplas doses, compreendendo FSH e LH, o surfactante seleccionado Pluronic F68 e um bacteriostático seleccionado de m-cresol e fenol, preferivelmente m-cresol. Preferivelmente, a FSH e LH estão presentes numa razão (FSH:LH) igual a ou cerca de 2:1 até igual a ou cerca de 1:1.

Noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica líquida, preferivelmente para utilização de múltiplas doses, compreendendo formar uma solução aquosa de FSH ou sua variante, o surfactante Pluronic F68 e um bacteriostático seleccionado de m-cresol e fenol, preferivelmente m-cresol, e API.

Noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica líquida, preferivelmente para utilização de múltiplas doses, compreendendo formar uma solução aquosa de LH, o surfactante Pluronic F68 e um bacteriostático seleccionado de m-cresol e fenol, preferivelmente m-cresol, e API.

Noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica líquida, preferivelmente para utilização de múltiplas doses, compreendendo formar uma solução aquosa de FSH e LH, o surfactante Pluronic® F68 e um bacteriostático seleccionado de m-cresol e fenol, preferivelmente m-cresol, e API.

Ainda noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica embalada, compreendendo distribuir uma solução compreendendo FSH, o surfactante Pluronic® F68 e um bacteriostático seleccionado de m-cresol e fenol, preferivelmente m-cresol.

Ainda noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica embalada, compreendendo distribuir uma solução compreendendo FSH e LH, o surfactante Pluronic® F68 e um bacteriostático seleccionado de m-cresol e fenol, preferivelmente m-cresol.

Ainda noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um artigo preparado para utilização farmacêutica humana, que compreende um frasco compreendendo uma solução de FSH, ou uma variante da FSH, o surfactante Pluronic® F68 e um bacteriostático seleccionado de m-cresol e fenol, preferivelmente m-cresol, e um folheto declarando que essa solução pode ser mantida durante um período igual a ou cerca de vinte e quatro horas ou mais após a primeira utilização. Preferivelmente, o folheto declara que a solução pode ser mantida durante um período igual a ou cerca de 12 ou 14 dias após a primeira utilização.

Ainda noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um artigo preparado para utilização farmacêutica humana, que compreende um frasco compreendendo uma solução de FSH e LH, o surfactante Pluronic® F68 e um bacteriostático seleccionado de m-cresol e fenol, preferivelmente m-cresol, e um folheto declarando que essa solução pode ser mantida durante um período igual a ou

cerca de vinte e quatro horas ou mais após a primeira utilização. Preferivelmente, o folheto declara que a solução pode ser mantida durante um período igual a ou cerca de 12 ou 14 dias após a primeira utilização.

Numa forma de realização particularmente preferida, a formulação compreende *m*-cresol e Pluronic F68. Os inventores descobriram surpreendentemente que formulações compreendendo Pluronic F68 não precipitam na presença de *m*-cresol, um problema observado com outros surfactantes.

Antes da primeira utilização, isto é, antes da violação da selagem do frasco, ampola ou cartucho, as formulações da invenção podem ser mantidas durante um período pelo menos igual a ou cerca de 6 meses, 12 meses ou 24 meses. Em condições preferidas de armazenamento, antes da primeira utilização, as formulações são mantidas protegidas de luz brilhante (preferivelmente no escuro), a temperaturas igual a ou cerca de 2-8°C, mais preferivelmente igual a ou cerca de 4-5°C.

Numa forma de realização específica, a invenção proporciona uma formulação liofilizada para reconstituição, preferivelmente para utilização de múltiplas doses, compreendendo FSH, ou uma sua variante, e o surfactante Pluronic® F68.

Noutra forma de realização específica, a invenção proporciona uma formulação liofilizada para reconstituição, preferivelmente para utilização de múltiplas doses, compreendendo LH, o surfactante Pluronic® F68.

Noutra forma de realização específica, a invenção proporciona uma formulação liofilizada, preferivelmente para utilização de múltiplas doses, compreendendo FSH e LH, o surfactante Pluronic® F68. Preferivelmente, a FSH e LH estão presentes numa razão (FSH:LH) igual a ou cerca de 2:1 até igual a ou cerca de 1:1.

Noutra forma de realização específica, a invenção proporciona um método de preparação de uma formulação liofilizada, preferivelmente para utilização de múltiplas doses após reconstituição, que compreende formar uma mistura de FSH, ou uma sua variante, com o surfactante Pluronic® F68, e sujeitar a referida mistura a liofilização.

Noutra forma de realização específica, a invenção proporciona um método de preparação de uma formulação liofilizada, preferivelmente para utilização de múltiplas doses após reconstituição, que compreende formar uma mistura de LH com o surfactante Pluronic® F68, e sujeitar a referida mistura a liofilização.

Noutra forma de realização específica, a invenção proporciona um método de preparação de uma formulação liofilizada, preferivelmente para utilização de múltiplas doses após reconstituição, que compreende formar uma mistura de FSH e LH bem como o surfactante Pluronic® F68, e sujeitar a referida mistura a liofilização.

Ainda noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica embalada, que compreende distribuir uma

mistura liofilizada compreendendo FSH e o surfactante Pluronic® F68.

Ainda noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica embalada, que compreende distribuir num recipiente uma mistura liofilizada compreendendo LH e o surfactante Pluronic® F68.

Ainda noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um método de preparação de uma composição farmacêutica embalada, que compreende distribuir num recipiente uma mistura liofilizada compreendendo FSH e LH e o surfactante Pluronic® F68.

Ainda noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um artigo preparado para utilização farmacêutica humana, que compreende um primeiro recipiente ou frasco compreendendo FSH, ou uma variante da FSH, liofilizada e o surfactante Pluronic® F68. Um segundo recipiente ou frasco contém um diluente para reconstituição, preferivelmente água e um bacteriostático seleccionado de m-cresol e fenol, preferivelmente m-cresol.

Ainda noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um artigo preparado para utilização farmacêutica humana, que compreende um primeiro recipiente ou frasco compreendendo LH, ou uma variante da LH, liofilizada e o surfactante Pluronic® F68. Um segundo recipiente ou frasco contém um diluente para reconstituição, preferivelmente água e um bacteriostático seleccionado de m-cresol e fenol, preferivelmente m-cresol.

Ainda noutra forma de realização preferida, a invenção proporciona um artigo preparado para utilização farmacêutica humana, que compreende um primeiro recipiente ou frasco compreendendo FSH, ou uma variante da FSH, bem como LH, ou uma variante da LH, liofilizadas e o surfactante Pluronic® F68. Um segundo recipiente ou frasco contém um diluente para reconstituição, preferivelmente água e um bacteriostático seleccionado de *m*-cresol e fenol, preferivelmente *m*-cresol.

Numa forma de realização particularmente preferida, o solvente para reconstituição compreende *m*-cresol. Os inventores descobriram que formulações liofilizadas compreendendo Pluronic F68 não precipitam quando reconstituídas com um diluente contendo *m*-cresol, um problema observado com outros surfactantes, por exemplo, Tween.

As formulações liofilizadas da invenção podem ser mantidas durante um período pelo menos igual a ou cerca de 6 meses, 12 meses ou 24 meses. Nas condições preferidas de armazenamento, antes da primeira utilização, as formulações são mantidas protegidas de luz brilhante (preferivelmente no escuro), a temperaturas iguais a ou cerca de 25, preferivelmente iguais a ou cerca de 2-8°C, mais preferivelmente iguais a ou cerca de 4-5°C.

Após a primeira utilização de uma formulação de múltiplas doses líquida ou reconstituída, pode ser mantida e utilizada durante um período pelo menos igual a ou cerca de 24 horas, preferivelmente pelo menos igual a ou cerca de 4, 5 ou 6 dias, mais preferivelmente até 12 ou 14 dias. Após a primeira utilização, a formulação é preferivelmente

armazenada a uma temperatura inferior à temperatura ambiente (isto é, menor do que 25°C ou do que cerca de 25°C), mais preferivelmente menor do que 10°C ou cerca de 10°C, mais preferivelmente igual a ou cerca de 2-8°C, muito preferivelmente igual a ou cerca de 5-0°C.

As formulações da invenção contêm o antioxidante metionina. O antioxidante evita a oxidação da FSH e LH (particularmente da subunidade α).

A metionina, na formulação líquida e/ou reconstituída, está preferivelmente presente numa concentração igual a ou cerca de 0,01 até igual a ou cerca de 1,0 mg/mL, mais preferivelmente igual a ou cerca de 0,05 até igual a ou cerca de 0,5 mg/mL, muito preferivelmente igual a ou cerca de 0,1 mg/mL.

Preferivelmente, as formulações da invenção contêm um mono- ou dissacárido ou um álcool de açúcar como agente estabilizador e de ajuste da tonicidade, como sucrose, dextrose, lactose, manitol e/ou glicerol. A sucrose é muito preferida, preferivelmente numa concentração igual a ou cerca de 60 mg/mL.

Como notado acima, a invenção proporciona formulações líquidas para utilização de dose única e múltiplas doses, contendo um bacteriostático ou à qual é adicionado um bacteriostático quando a formulação é reconstituída. As formulações da invenção são adequadas para utilização farmacêutica ou veterinária.

Como notado acima, numa forma de realização preferida, a invenção proporciona um artigo preparado compreendendo material de embalagem e um frasco compreendendo uma

solução de FSH ou uma variante da FSH, LH, ou FSH e LH, Pluronic F68, metionina e um bacteriostático seleccionado de fenol e *m*-cresol, opcionalmente com tampões e/ou outros excipientes, num diluente aquoso, em que o referido material de embalagem compreende um folheto que indica que essa solução pode ser mantida durante um período de vinte e quatro horas ou mais após a primeira utilização. A invenção também compreende um artigo preparado, compreendendo material de embalagem, um frasco compreendendo uma formulação de FSH ou uma variante da FSH de acordo com a invenção, em que o referido material de embalagem compreende um folheto que dá instruções a um paciente para reconstituir a FSH ou uma variante da FSH no diluente aquoso de modo a formar uma solução que pode ser mantida durante um período de vinte e quatro horas ou mais.

Como notado acima, numa forma de realização preferida, a invenção proporciona um artigo preparado compreendendo material de embalagem e um frasco compreendendo FSH ou uma variante da FSH, LH ou uma variante da LH, ou FSH e LH liofilizadas, Pluronic F68 e metionina. O bacteriostático presente no segundo recipiente que inclui o diluente é seleccionado de fenol e *m*-cresol, opcionalmente com outros excipientes, em que o referido material de embalagem compreende um folheto que indica que essa solução pode ser mantida durante um período de vinte e quatro horas ou mais após a primeira utilização.

A gama de hormona proteica nas formulações da invenção inclui quantidades que originam, por reconstituição, concentrações desde cerca de 1,0 µg/mL até cerca de 50 mg/mL, apesar de concentrações menores e maiores serem operáveis e dependerem do veículo de distribuição

pretendido, por exemplo, formulações em solução irão diferir de métodos de emplastos transdérmicos, pulmonares, transmucosos ou de bombas osmóticas ou de micro-bombas. A concentração da hormona proteica é preferivelmente igual a ou cerca de 5,0 µg/mL até igual a ou cerca de 2 mg/mL, mais preferivelmente igual a ou cerca de 10 µg/mL até igual a ou cerca de 1 mg/mL, muito preferivelmente igual a ou cerca de 50 µg/mL até igual a ou cerca de 200 µg/mL.

A gama de hormona proteica nas formulações da invenção inclui quantidades que originam, por reconstituição, concentrações desde cerca de 1,0 µg/mL até cerca de 50 mg/mL, apesar de concentrações menores e maiores serem operáveis e dependerem do veículo de distribuição pretendido, por exemplo, formulações em solução irão diferir de métodos de emplastos transdérmicos, pulmonares, transmucosos ou de bombas osmóticas ou de micro-bombas. A concentração da hormona proteica é preferivelmente igual a ou cerca de 5,0 µg/mL até igual a ou cerca de 2 mg/mL, mais preferivelmente igual a ou cerca de 10 µg/mL até igual a ou cerca de 1 mg/mL, muito preferivelmente igual a ou cerca de 50 µg/mL até igual a ou cerca de 200 µg/mL.

Preferivelmente, as formulações da invenção retêm pelo menos 80% ou cerca de 80% da actividade de FSH e/ou actividade de LH na altura do embalamento durante um período de 24 meses (antes da primeira utilização). A actividade de FSH pode ser medida usando o bioensaio de ganho de peso ovariano de Steelman-Pohley⁵. A actividade de LH pode ser medida usando o bioensaio de ganho de peso de vesículas seminais de rato.

As formulações líquidas da presente invenção podem ser preparadas por um processo que compreende misturar FSH ou uma variante da FSH, LH, ou uma mistura de FSH e LH e Pluronic F68 e um bacteriostático seleccionado de fenol e *m*-cresol na forma de sólidos, ou dissolver FSH ou uma variante da FSH, LH, ou uma mistura de FSH e LH ("proteína") e Pluronic F68 e um bacteriostático seleccionado de fenol e *m*-cresol num diluente aquoso. A mistura dos componentes e a sua dissolução num diluente aquoso são efectuadas empregando procedimentos convencionais de dissolução e mistura. Para preparar uma formulação adequada, por exemplo, uma quantidade medida de FSH ou variante da FSH, LH ou uma mistura de FSH e LH em solução tamponada é combinada com Pluronic F68 e um bacteriostático seleccionado de fenol e *m*-cresol numa solução tamponada em quantidades suficientes para proporcionar a proteína, Pluronic F68 e o bacteriostático nas concentrações desejadas. A solução resultante é então distribuída em frascos, ampolas ou cartuchos. Variações deste processo serão reconhecidas pelo profissional. Por exemplo, a ordem da adição dos componentes, se são utilizados aditivos adicionais, a temperatura e pH aos quais é preparada a formulação, são todos factores que podem ser optimizados para a concentração e meio de administração utilizados.

Numa forma de realização preferida, as formulações líquidas da invenção são produzidas preparando soluções de lotes individuais de concentração conhecida de todos os componentes da formulação (por exemplo, tampão de fosfato de sódio, sucrose, TWEEN, metionina, FSH e/ou LH), e recolhendo alíquotas de quantidades volumétricas para formar uma "solução-mãe" com a mesma composição da

formulação final. A "solução-mãe" é preferivelmente filtrada numa membrana de PDF de 0,22 micrones Duropore® (Millipore), para remover microrganismos, e depois alíquotas são distribuídas em recipientes individuais, como frascos, ampolas ou cartuchos.

As formulações liofilizadas da presente invenção podem ser preparadas por um processo que compreende misturar FSH ou uma variante da FSH, LH ou uma variante da FSH, ou uma mistura de FSH e LH e Pluronic F68, bem como outros excipientes, como o antioxidante metionina e/ou um tampão, e sujeitar a mistura a uma liofilização. A mistura dos componentes e sua liofilização são efectuadas empregando procedimentos convencionais. Para preparar uma formulação adequada, por exemplo, uma quantidade medida de FSH ou variante da FSH, LH ou variante da LH ou uma mistura de FSH e LH é combinada com Pluronic F68, e a mistura resultante é liofilizada e depois distribuída em frascos, ampolas ou cartuchos. Variações deste processo serão reconhecidas pelo profissional. Por exemplo, a ordem da adição dos componentes, se são utilizados aditivos adicionais, a temperatura e pH aos quais é preparada a formulação, são todos factores que podem ser optimizados para a concentração e meio de administração utilizados.

As formulações da invenção podem ser administradas utilizando dispositivos reconhecidos. Exemplos compreendendo estes sistemas num único frasco dispositivos de injector em caneta para distribuição de uma solução, como EasyJect®, Caneta Gonal-F®, Humaject®, NovoPen®, Caneta B-D®, AutoPen® e OptiPen®.

Os produtos presentemente reivindicados incluem material de embalagem. O material de embalagem proporciona, para além das informações requeridas pelas autoridades regulamentadoras, as condições em que o produto pode ser utilizado. O material de embalagem da presente invenção proporciona instruções ao paciente para reconstituir a FSH ou uma variante da FSH no diluente aquoso, de modo a formar uma solução, e para usar a solução durante um período de vinte e quatro horas ou mais para o produto húmido/seco de dois frascos. Para o produto em solução num único frasco, a etiqueta indica que essa solução pode ser armazenada depois da primeira utilização durante um período de vinte e quatro horas ou mais, preferivelmente até 12 ou 14 dias. Os produtos presentemente reivindicados são úteis para utilização humana do produto farmacêutico.

As formulações estáveis conservadas podem ser administradas a pacientes na forma de soluções límpidas. A solução pode destinar-se a uma única utilização ou pode ser reutilizada múltiplas vezes, e pode ser suficiente para um único ciclo ou múltiplos ciclos de tratamento do paciente; desse modo proporciona um regime de tratamento mais conveniente do que os correntemente disponíveis.

A FSH ou uma variante da FSH, LH, ou misturas de FSH e LH, nas formulações ou soluções estáveis ou conservadas descritas aqui, podem ser administradas a um paciente de acordo com a presente invenção via uma variedade de métodos de distribuição, incluindo injeção SC ou IM; via transdérmica, pulmonar, transmucosa, implante, bomba osmótica, cartucho, micro-bomba, via oral, ou outros meios apreciados pelo profissional, como é bem conhecido na área.

Apresentam-se os exemplos seguintes meramente para ilustrar a preparação das formulações e composições da invenção. Não deve considerar-se que o âmbito da invenção consiste meramente nos exemplos seguintes.

Exemplo 1

Formulações comparativas

Materiais

Item	Fabricante
r-hFSH em volume usada para formulações candidatas	Laboratoires Serono SA
D-Manitol (DAB, F. Eur., BP, FU, USP, FCC, E421)	Merck
Sucrose (DAB, F. Eur., BP, NF)	Merck
NaCl (ACS, ISO)	Merck
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (Q. para análise)	Merck
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (Q. para análise)	Merck
Álcool Benzílico (Q. para análise)	Merck
m-Cresol (para síntese)	Merck
TWEEN 20 (Polissorbato 20) (para síntese)	Merck
Pluronic F68 (Poloxâmero 188)	Sigma
L-Metionina (para bioquímica)	Merck
Ácido Orto-fosfórico 85% (F. Eur., BP, NF)	Merck
Cartucho de vidro de 1,5 mL	SFAM (tratado com silicone na Aguettant)
Borrachas do Tipo A	West Company
Tampas de engate por pressão	Aguettant
Millex-GV Unidade de Filtração Conduzida por Seringa - Durapore	Millipore
Filtros de Membranas Durapore 0,22 µm GV	Millipore
Seringa de plástico Plastipak de 20 mL	Becton Dickinson
Suporte de aço para filtração	Sartorius

Equipamento

Sistemas de HPLC	Detector mod. 486 ou 490 Controlador mod. 600S Bomba mod. 626 Dispositivo de auto-amostragem mod. 717	Waters	2
Medidor de pH	Mod. 654	Metrohm	1
Osmómetro	030-D	Osmomat	1

O estudo seguinte avaliou os parâmetros seguintes para um grande número de formulações:

- Compatibilidade do surfactante e bacteriostático

- Oxidação da subunidade alfa

As formulações consistiram em formulações de múltiplas doses e continham TWEEN 20 ou Pluronic F68, bem como um agente bacteriostático. Avaliaram-se os seguintes três agentes bacteriostáticos:

- Álcool benzílico 0,9%
- *m*-Cresol 0,3%
- Fenol 0,5%

O TWEEN 20 e Pluronic F68 foram utilizados nas seguintes gamas de concentrações:

- TWEEN 20: intervalo desde 10 até 100 µg/g
- Pluronic F68: intervalo desde 10 to 100 µg/g

As soluções preparadas estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Formulações comparativas							
ID #	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (mg/g)	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (mg/g)	r-hFSH* IU/g	Pluronic F68 (µg/g)	TWEEN 20 (µg/g)	Bacteriostático	Excipiente (mg/g)
1P	1,11	0,45	600 IU/g	10	-	0,5% Fenol	Sucrose 70,6
2P	1,11	0,45	600 IU/g	10	-	0,5% Fenol	Manitol 38,7
3P	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	0,5% Fenol	Sucrose 70,6
4P	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	0,5% Fenol	Manitol 38,7
5P	1,11	0,45	600 IU/g	-	10	0,5% Fenol	Sucrose 70,6
6P	1,11	0,45	600 IU/g	-	10	0,5% Fenol	Manitol 38,7
7	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	0,9% Álcool benzílico	NaCl 6,0
8	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	0,9% Álcool benzílico	Sucrose 62,3
9	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	0,9% Álcool benzílico	Manitol 34,1
10	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	0,3% m-Cresol	NaCl 7,6
11	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	0,3% m-Cresol	Sucrose 78,0
12	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	0,3% m-Cresol	Manitol 42,7
13	1,11	0,45	600 IU/g	-	10	0,9% Álcool benzílico	NaCl 0,6
14	1,11	0,45	600 IU/g	-	10	0,9% Álcool benzílico	Sucrose 62,3
15	1,11	0,45	600 IU/g	-	10	0,9% Álcool benzílico	Manitol 34,1
16	1,11	0,45	600 IU/g	-	10	0,3% m-Cresol	NaCl 7,6
17	1,11	0,45	600 IU/g	-	10	0,3% m-Cresol	Sucrose 78,0

Tabela 1: Formulações comparativas							
ID #	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (mg/g)	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (mg/g)	r- hFSH* IU/g	Pluronic F68 (µg/g)	TWEEN 20 (µg/g)	Bacteriostático	Excipiente (mg/g)
18	1,11	0,45	600 IU/g	-	10	0,3% m-Cresol	Manitol 42,7
19	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	0,9% Álcool benzílico	NaCl 6,0
20	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	0,9% Álcool benzílico	Sucrose 62,3
21	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	0,9% Álcool benzílico	Manitol 34,1
22	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	0,3% m-Cresol	NaCl 7,6
23	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	0,3% m-Cresol	Sucrose 78,0
24	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	0,3% m-Cresol	Manitol 42,7
25	1,11	0,45	600 IU/g	10	-	0,9% Álcool benzílico	NaCl 6,0
26	1,11	0,45	600 IU/g	10	-	0,9% Álcool benzílico	Sucrose 62,3
27	1,11	0,45	600 IU/g	10	-	0,9% Álcool benzílico	Manitol 34,1
28	1,11	0,45	600 IU/g	10	-	0,3% m-Cresol	NaCl 7,6
29	1,11	0,45	600 IU/g	10	-	0,3% m-Cresol	Sucrose 78,0
30	1,11	0,45	600 IU/g	10	-	0,3% m-Cresol	Manitol 42,7

* A FSH foi adicionada às formulações com base na sua biopotência em vez do teor proteico.

Do exame visual das formulações foi determinado que o TWEEN 20 não pode ser utilizado com *m*-cresol e fenol porque as formulações de FSH contendo TWEEN 20 e *m*-cresol ou TWEEN 20 e fenol exibiram uma suspensão opalescente branca. Em contraste, as formulações de FSH contendo Pluronic F68 não exibiram este problema com o *m*-cresol e fenol. A utilização de Pluronic F68 permite a utilização de fenol e *m*-cresol.

Combinação de FSH e Pluronic F68 com antioxidantes

Avaliaram-se os seguintes antioxidantes quanto à sua capacidade para inibir a oxidação da subunidade α na presença de Pluronic F68:

- Metionina: gama desde 10 até 100 $\mu\text{g/g}$
- Ácido Ascórbico: gama desde 10 até 100 $\mu\text{g/g}$

Utilizaram-se sucrose e Manitol como agentes de tonicidade, e adicionou-se TWEEN 20 ou Pluronic na concentração de 100 $\mu\text{g/g}$.

As formulações preparadas estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Formulações comparativas com e sem metionina									
ID #	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (mg/g)	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (mg/g)	R hFSH IU/g	Pluro- nic F68 (µg/g)	TWEEN (µg/g)	Ácido Ascór- bico (µg/g)	Metio- nina (µg/g)	Bacterios- tático	Exci- piente
31	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	-	0,3% m- Cresol	Sucrose
32	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	-	0,3% m- Cresol	Manitol
33	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	-	-	0,9% Álcool benzílico	Sucrose
34	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	-	-	0,9% Álcool benzílico	Manitol
35	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	-	0,9% Álcool benzílico	Sucrose
36	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	-	0,9% Álcool benzílico	Manitol
37	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	10	0,3% m- Cresol	Sucrose
38	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	10	0,3% m- Cresol	Manitol
39	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	100	0,3% m- Cresol	Sucrose
40	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	100	0,3% m- Cresol	Manitol
41	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	10	-	0,3% m- Cresol	Sucrose
42	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	10	-	0,3% m- Cresol	Manitol
43	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	100	-	0,3% m- Cresol	Sucrose
44	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	100	-	0,3% m- Cresol	Manitol
45	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	-	10	0,9% Álcool	Sucrose

Tabela 2. Formulações comparativas com e sem metionina									
ID #	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (mg/g)	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (mg/g)	R hFSH IU/g	Pluro-nic F68 (µg/g)	TWEEN (µg/g)	Ácido Ascórbico (µg/g)	Metionina (µg/g)	Bacterios-tático	Exci-piente
								benzílico	
46	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	-	10	0,9% Álcool benzílico	Manitol
47	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	-	100	0,9% Álcool benzílico	Sucrose
48	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	-	100	0,9% Álcool benzílico	Manitol
49	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	10	-	0,9% Álcool benzílico	Sucrose
50	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	10	-	0,9% Álcool benzílico	Manitol
51	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	100	-	0,9% Álcool benzílico	Sucrose
52	1,11	0,45	600 IU/g	-	100	100	-	0,9% Álcool benzílico	Manitol
53	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	10	0,9% Álcool benzílico	Sucrose
54	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	10	0,9% Álcool benzílico	Manitol
55	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	100	0,9% Álcool benzílico	Sucrose
56	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	100	0,9% Álcool benzílico	Manitol

Tabela 2. Formulações comparativas com e sem metionina									
ID #	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (mg/g)	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (mg/g)	R hFSH IU/g	Pluro-nic F68 (µg/g)	TWEEN (µg/g)	Ácido Ascórbico (µg/g)	Metionina (µg/g)	Bacterios-tático	Exci-piente
57	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	10	-	0,9% Álcool benzílico	Sucrose
58	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	10	-	0,9% Álcool benzílico	Manitol
59	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	100	-	0,9% Álcool benzílico	Sucrose
60	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	100	-	0,9% Álcool benzílico	Manitol
61	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	-	Fenol	Sucrose
62	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	-	Fenol	Manitol
63	1,11	0,45	600 IU/g					Fenol	Sucrose
64	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	10	Fenol	Manitol
65	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	100	Fenol	Sucrose
66	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	-	100	Fenol	Manitol
67	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	10	-	Fenol	Sucrose
68	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	10	-	Fenol	Manitol
69	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	100	-	Fenol	Sucrose
70	1,11	0,45	600 IU/g	100	-	100	-	Fenol	Manitol

A FSH foi adicionada às formulações com base na sua biopotência em vez do teor proteico.

Prepararam-se 20 g de cada formulação em tubos de polipropileno Falcon, tendo sido filtrados numa Unidade de filtração conduzida por seringa Millex-GV de 3 cm² e 0,22 µm Durapore e depois analisados quanto a um valor em t=0. Em seguida, as soluções foram armazenadas a 40°C e testadas de acordo com o esquema seguinte:

Teste analítico	T=0	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
HPLC de Fase Reversa quanto a subunidade alfa oxidada (%)	X	X	X	X	X
HPLC de Exclusão por Tamanhos para quantificação de proteínas (µg/g)	X	X	X	X	X
HPLC de Exclusão por Tamanhos quanto a subunidades livres quantitativas	X	X	X	X	X

(X): Teste realizado

A HPLC de fase reversa revela que, em formulações contendo FSH, Pluronic F68, *m*-cresol e metionina (a 10 e 100 µg/mL), a oxidação da subunidade α da FSH, quando a formulação é armazenada a 40°C, é grandemente reduzida *versus* uma formulação não contendo metionina, como pode ser observado na Figura 1. Com base na média de duas experiências, na Formulação não contendo metionina, a percentagem de subunidade α oxidada é 2,3 a T=0, 4,0 a T=1 semana e 7,1 a T=2 semanas. Na formulação contendo 10 µg/mL de metionina, a percentagem de subunidade α oxidada é 2,0 a T=0, 3,2 a T=1 semana e 3,8 a T=2 semanas. Na formulação contendo 100 µg/mL de metionina, a percentagem de subunidade α oxidada é 1,8 a T=0, 1,7 a T=1 semana e 1,3 a T=2 semanas.

Exemplo 2**Formulação líquida de dose única de FSH recombinante para injeção subcutânea ou intramuscular**

Com base nos resultados do Exemplo 1 preparou-se a formulação seguinte.

Prepararam-se os componentes 1 até 7 listados na Tabela 3 na forma de soluções volumétricas em API. Adicionaram-se alíquotas de cada solução a um reactor de mistura para formar uma "solução-mãe". A solução-mãe foi distribuída em frascos de modo a conterem 10,9 microgramas (150 IU) ou 5,45 microgramas (75 IU) de FSH.

Com a FSH recombinante, a bioactividade e actividade específica são consistentes, permitindo a carga da FSH por massa em vez de por bioensaio.

Componente #	Descrição	FSH 150 IU	FSH 75 IU
1	rhFSH (µg/frasco)	10,9 (150 IU)	5,45 (75 IU)
2	Sucrose (mg/frasco)	15,00	7,50
3	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (mg/frasco)	0,111	0,0555
4	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (mg/frasco)	0,273	0,1365
5	Pluronic F68 (mg/frasco)	0,025	0,0125
6	Metionina (mg/frasco)	0,025	0,0125
7	<i>m</i> -cresol (mg/frasco)	0,75	0,375
8	pH	7,0	7,0
9	API	<i>q.s.</i> para 1 mL	<i>q.s.</i> para 0,5mL

Os frascos foram cheios e selados em condições esterilizadas. A formulação tem um tempo de vida por armazenamento de até dois anos à temperatura ambiente.

Exemplo 3**Formulação líquida de múltiplas doses de FSH recombinante para injeção subcutânea ou intramuscular**

Com base nos resultados do Exemplo 1 preparou-se a seguinte formulação de múltiplas doses.

Prepararam-se os componentes 1 até 7 listados na Tabela 4 na forma de soluções volumétricas em API. Adicionaram-se alíquotas de cada solução a um reactor de mistura para formar uma "solução-mãe". A solução-mãe foi distribuída em frascos de modo a conterem 22,2 microgramas (305 IU), 33,3 microgramas (458 IU) e 66,7 microgramas (916 IU) de FSH. As formulações resultantes distribuem um total de 300, 450 e 900 IU de FSH.

Os cartuchos foram cheios e selados em condições esterilizadas. A formulação de múltiplas doses pode ser armazenada a uma temperatura igual a ou cerca de 2-8°C, mais preferivelmente igual a ou cerca de 4-5°C, até à primeira utilização durante um período até dois anos. Após a primeira utilização, o cartucho deve ser armazenado a uma temperatura igual a ou cerca de 2-8°C, mais preferivelmente igual a ou cerca de 4-5°C, durante o período de múltiplas doses, que pode ser 24 horas, 2 dias ou até 12 ou 14 dias.

Compo- nente #	Descrição	FSH 300 IU	FSH 450 IU	FSH 900 IU
1	rhFSH (µg/cartucho)	22,2 (305 IU)	33,3 (458 IU)	66,7 (916 IU)
2	Sucrose (mg/cartucho)	30,0	45,0	90,0
3	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (mg/cartucho)	0,225	0,337	0,675
4	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (mg/cartucho)	0,555	0,832	1,665
5	Pluronic F68 (mg/frasco)	0,050	0,075	0,150
6	Metionina (mg/frasco)	0,050	0,075	0,150
7	m-cresol (mg/frasco)	1,50	2,25	4,50
8	pH	7,0	7,0	7,0
9	API	q.s. para 0,5 mL	q.s. para 0,75 mL	q.s. para 1,5 mL

Exemplo 4**Formulação líquida de dose única de LH recombinante para injeção subcutânea ou intramuscular**

Preparou-se a formulação seguinte.

Prepararam-se os componentes 1 até 7 listados na Tabela 5 na forma de soluções volumétricas em API. Adicionaram-se alíquotas de cada solução a um reactor de mistura para formar uma "solução-mãe". A solução-mãe foi distribuída em frascos de modo a conterem 3 microgramas (75 IU) de LH. A formulação resultante distribui uma única dose de LH de 75 IU.

Com a LH recombinante, a bioactividade e actividade específica são consistentes, permitindo a carga da LH por massa em vez de por bioensaio.

Componente #	Descrição	LH 75 IU
1	rhLH ($\mu\text{g}/\text{frasco}$)	3,0
2	Sucrose (mg/frasco)	52,5
3	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (mg/frasco)	0,052
4	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mg/frasco)	0,825
5	Pluronic F68 (mg/frasco)	0,0125
6	Metionina (mg/frasco)	0,125
7	<i>m</i> -cresol (mg/frasco)	0,375
9	API	q.s. para 0,5 mL

Os frascos foram cheios e selados em condições esterilizadas. A formulação tem um tempo de vida por armazenamento de até dois anos.

Exemplo 5**Formulações líquidas de múltiplas doses de FSH e LH (2:1) recombinantes para injeção subcutânea ou intramuscular**

Prepararam-se as seguintes formulações de múltiplas doses de FSH e LH, com razão FSH:LH de 2:1.

Prepararam-se os componentes 1 até 8 listados na Tabela 6 na forma de soluções volumétricas em API. Adicionaram-se alíquotas de cada solução a um reactor de mistura, tendo sido misturadas para formar uma "solução-mãe". O pH da solução-mãe foi ajustado para 8,0, se necessário, por adição de NaOH ou HCl. A solução-mãe foi distribuída em cartuchos de modo a conterem 18,3 microgramas de LH (457 IU) com 66,7 microgramas de FSH (916 IU), destinados a 6 doses de 150 IU de FSH cada; 9,2 microgramas de LH (230 IU) com 33,3 microgramas de FSH (458 IU), destinados a 3 doses de 150 IU de FSH cada, e 6,1 microgramas de LH (152,5 IU) com 22,23 microgramas de FSH (305 IU), destinados a 2 doses de 150 IU de FSH cada.

Os cartuchos foram cheios e selados em condições esterilizadas. A formulação de múltiplas doses pode ser armazenada a uma temperatura igual a ou cerca de 2-8°C, mais preferivelmente igual a ou cerca de 4-5°C, até à primeira utilização durante um período até dois anos. Após a primeira utilização, o cartucho deve ser armazenado a uma temperatura igual a ou cerca de 2-8°C, mais preferivelmente igual a ou cerca de 4-5°C, durante o período de múltiplas doses, que pode ser 24 horas, 2 dias ou até 12 ou 14 dias.

Tabela 6. Componentes de formulações líquidas de múltiplas doses de FSH e LH (2:1)				
Compo- nente #	Descrição	6 doses	3 doses	2 doses
1	rhLH (µg/cartucho)	18,3 (457 IU)	9,2 (230 IU)	6,1 (152,5 IU)
2	rhFSH (µg/cartucho)	66,7 (916 IU)	33,3 (458 IU)	22,23 (305 IU)
3	Sucrose (mg/cartucho)	115,5	57,75	38,5
4	H ₃ PO ₄ (mg/cartucho)	1,35	0,735	0,49
5	NaOH (mg/cartucho)	q.s. para pH 8,0	q.s. para pH 8,0	q.s. para pH 8,0
6	Pluronic F68 (mg/frasco)	375,0	187,5	125,0
7	Metionina (µg/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	q.s. para 1,5 mL	q.s. para 0,75 mL	q.s. para 0,5 mL

Exemplo 6

Formulações líquidas de múltiplas doses de FSH e LH (1:1) recombinantes para injeção subcutânea ou intramuscular

Prepararam-se as seguintes formulações de múltiplas doses de FSH e LH, com razão FSH:LH de 1:1.

Prepararam-se os componentes 1 até 8 listados na Tabela 7 na forma de soluções volumétricas em API. Adicionaram-se alíquotas de cada solução a um reactor de mistura, tendo sido misturadas para formar uma "solução-mãe". O pH da solução-mãe foi ajustado para 8,0, se necessário, por adição de NaOH ou HCl. A solução-mãe foi distribuída em cartuchos de modo a conterem 36,6 microgramas de LH (914

IU) com 66,7 microgramas de FSH (916 IU), destinados a 6 doses de 150 IU de FSH cada; 18,4 microgramas de LH (460 IU) com 33,3 microgramas de FSH (458 IU), destinados a 3 doses de 150 IU de FSH cada, e 12,2 microgramas de LH (305 IU) com 22,23 microgramas de FSH (305 IU), destinados a 2 doses de 150 IU de FSH cada.

Os cartuchos foram cheios e selados em condições esterilizadas. A formulação de múltiplas doses pode ser armazenada a uma temperatura igual a ou cerca de 2-8°C, mais preferivelmente igual a ou cerca de 4-5°C, até à primeira utilização durante um período até dois anos. Após a primeira utilização, o cartucho deve ser armazenado a uma temperatura igual a ou cerca de 2-8°C, mais preferivelmente igual a ou cerca de 4-5°C, durante o período de múltiplas doses, que pode ser 24 horas, 2 dias ou até 12 ou 14 dias.

Tabela 7. Componentes de formulações líquidas de múltiplas doses de FSH e LH (1:1)				
Compo- nente #	Descrição	6 doses	3 doses	2 doses
1	rhLH (µg/cartucho)	36,6 (914 IU)	18,4 (460 IU)	12,2 (305 IU)
2	rhFSH (µg/cartucho)	66,7 (916 IU)	33,3 (458 IU)	22,23 (305 IU)
3	Sucrose (mg/cartucho)	115,5	57,75	38,5
4	H ₃ PO ₄ (mg/cartucho)	1,35	0,735	0,49
5	NaOH (mg/cartucho)	q.s. para pH 8,0	q.s. para pH 8,0	q.s. para pH 8,0
6	Pluronic F68 (mg/frasco)	375,0	187,5	125,0
7	Metionina (µg/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	q.s. para 1,5 mL	q.s. para 0,75mL	q.s. para 0,5 mL

Exemplo 7**Experiências de estabilidade para formulações líquidas de múltiplas doses de FSH misturada com LH****7.1. Análise de HPLC de fase reversa quanto ao teor de proteínas**

A formulação do Exemplo 5 (6 doses) foi avaliada quanto ao teor proteico para a FSH e LH, utilizando um método de HPLC de fase reversa.

O teor proteico (FSH e LH) foi medido no instante zero e após 1, 2, 3 e 6 meses de armazenamento da formulação a 4°C. Os resultados estão listados na Tabela 8 em microgramas de FSH ou LH por grama de solvente.

7.2. Ensaio da subunidade alfa oxidada

A percentagem de subunidade alfa oxidada numa formulação do Exemplo 5 foi medida por um método de HPLC de fase reversa (RP-HPLC).

A percentagem de subunidade alfa oxidada foi medida no instante zero e após 1, 2, 3 e 6 meses de armazenamento a 4°C. Os resultados estão listados na Tabela 8.

7.3. Ensaio *in vivo* quanto à FSH

A formulação do Exemplo 5 (6 doses) foi testada quanto à actividade de FSH utilizando o bioensaio de ganho de peso ovariano de Steelman-Pohley no instante zero e após 1, 2, 3 e 6 meses de armazenamento a 4°C. Os resultados estão listados na Tabela 8 em unidades internacionais (IU) por grama de solvente.

7.4. Ensaio *in vivo* quanto à LH

A formulação do Exemplo 5 (6 doses) foi testada quanto à actividade de LH utilizando o bioensaio de ganho de peso de vesículas seminais de rato no instante zero e após 1, 2, 3 e 6 meses de armazenamento a 4°C. Os resultados estão listados na Tabela 8 em unidades internacionais (IU) por grama de solvente.

7.5. Avaliação de subunidades livres (rFSH + rLH)

Para uma formulação do Exemplo 5 avaliou-se a percentagem de subunidades livres por SDS-PAGE.

As medições foram feitas no instante zero e após 1, 2, 3 e 6 meses de armazenamento a 4°C. Os resultados estão apresentados em percentagem do total de proteínas (rFSH + rLH) e estão listados na Tabela 8.

7.5. Avaliação de agregados

Para uma formulação do Exemplo 5 avaliou-se a percentagem de agregados por SDS-PAGE como descrito acima para a avaliação de subunidades livres em 7.5., com a excepção de agregados de maior peso molecular terem sido determinados em percentagem do total de proteínas (rFSH + rLH). As medições foram feitas no instante zero e após 1, 2, 3 e 6 meses de armazenamento a 4°C. Os resultados estão listados na Tabela 8.

7.6. Partículas visíveis

A formulação do Exemplo 5 foi avaliada visualmente quanto a partículas no instante zero e após 3 e 6 meses de armazenamento a 4°C. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

7.7. pH

O pH de uma formulação do Exemplo 5 foi medido no instante zero e após 1, 2, 3 e 6 meses de armazenamento a 4°C. Os resultados estão listados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros analíticos de uma formulação líquida de FSH e LH (2:1) no instante zero e após armazenamento a 4°C durante 1, 2, 3 e 6 meses					
Ensaio	Instante zero	1 mês	2 meses	3 meses	6 meses
Teor de rFSH por RP-HPLC (microgramas/g)	46,50	46,98	46,71	46,31	44,98
Teor de rLH por RP-HPLC (microgramas/g)	11,74	11,81	12,68	12,67	13,21
% Subunidade alfa oxidada	2,29	2,17	2,08	2,48	2,95
Ensaio <i>in vivo</i> quanto a FSH 553 (IU/g)	566	Não testado	Não testado	Não testado	578 (23 semanas)
Ensaio <i>in vivo</i> quanto a LH (IU/g)	331	Não testado	Não testado	311	286
Subunidades livres por SDS-PAGE (rFSH + rLH; %)	≤ 5	Não testado	Não testado	≤ 5	≤ 5 (23 semanas)
Agregados por SDS-PAGE (rFSH + rLH; %)	≤ 2	Não testado	Não testado	> 3	4
Partículas visíveis	Nenhumas	Não testado	Não testado	Nenhumas	Nenhumas
pH	8,262	8,215	8,216	8,188	8,283

Exemplo 8

Formulação liofilizada de múltiplas doses de FSH e LH

Prepararam-se duas formulações liofilizadas A e B com as composições seguintes.

Formulação A

FSH	µg 32,75 (450 I.U.)
LH	µg 9,0 (225 I.U.)
Sucrose	mg 15,0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	mg 0,052
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	mg 0,825
Pluronic F-68	mg 0,05
L-Metionina	mg 0,05

Formulação B

FSH	µg 65,5 (900 I.U.)
LH	µg 18,0 (450 I.U.)
Sucrose	mg 30,0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	mg 0,104
Na ₂ HPO ₄	mg 1,65
Pluronic F68	mg 0,10
L-Metionina	mg 0,10

O processo de preparação consiste na mistura do fármaco directamente com os ingredientes, filtração da solução obtida e liofilização do filtrado.

Apresenta-se a seguir uma descrição de cada passo do processo:

- a um recipiente com tara feita adicionar API, hidrogenofosfato dissódico di-hidratado, di-hidrogenofosfato de sódio mono-hidratado, Sucrose, Pluronic F68 a 5% e L-metionina e agitar durante 10 minutos até à dissolução completa;
- verificar o pH e eventualmente corrigi-lo para pH 7,00 ± 0,2 com NaOH 10% ou H₃PO₄ diluído;
- adicionar FSH e LH à mistura preparada acima e agitar suavemente a solução obtida durante 10 minutos;

- verificar novamente o pH e eventualmente ajustá-lo para $7,0 \pm 0,1$ com NaOH 10% ou H_3PO_4 diluído;
- filtrar a solução com uma membrana de 0,22 μm Durapore, com uma razão de filtração não inferior a 15 g/cm^2 , sob fluxo de Azoto, com uma pressão não superior a 1,5 atm;
- recolher a solução num balão previamente esterilizado;
- encher o recipiente de vidro com a solução filtrada, colocar a tampa e colocar os frascos cheios num tabuleiro de aço inoxidável;
- colocar os tabuleiros no dispositivo de liofilização e liofilizar o produto empregando o seguinte ciclo de liofilização:
 - equilibrar a $+4^\circ C$ durante cerca de 20 minutos;
 - ajustar a temperatura das prateleiras para $-25^\circ C$ e manter durante 2 horas;
 - ajustar a temperatura das prateleiras para $-15^\circ C$ e manter durante 1 hora;
 - ajustar a temperatura das prateleiras para $-45^\circ C$ e manter durante 3 horas;
 - ajustar a temperatura do condensador para $-65^\circ C$;
 - aplicar vácuo à câmara;
 - quando o vácuo atingir um valor de 7×10^{-2} mBar, aumentar a temperatura das prateleiras para $-10^\circ C$ e manter durante 14 horas;
 - aumentar a temperatura das prateleiras para $+35^\circ C$ em 8 horas e manter até ao final do ciclo (14 horas);
 - interromper o vácuo, permitindo a entrada de azoto seco na câmara;
 - tapar os recipientes com o sistema automático do dispositivo de liofilização;

- selar os frascos tapados com as tampas Flip-Off apropriadas.

As formulações A e B foram armazenadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e foram testadas quanto à estabilidade e actividade biológica como esboçado abaixo. Antas da análise das composições, estas são reconstituídas utilizando água para injeção compreendendo 0,3% de m-Cresol como agente bacteriostático.

Os valores da estabilidade e actividade biológica foram determinados do modo seguinte.

- Ensaio *in vivo* quanto à FSH: A formulação foi testada quanto à actividade de FSH empregando o bioensaio de ganho de peso ovariano de Steelman-Pohley.
- Ensaio *in vivo* quanto à LH: A formulação foi testada quanto à actividade de LH empregando o bioensaio de ganho de peso de vesículas seminais de rato.
- Ensaio da subunidade alfa oxidada: A percentagem de subunidade alfa oxidada foi medida por um método de HPLC de fase reversa (RP-HPLC).
- Avaliação de subunidades livres (rFSH + rLH): A percentagem de subunidades livres foi avaliada por SDS-PAGE.
- Avaliação de agregados: A percentagem de agregados foi avaliada por SDS-PAGE como descrito acima para a avaliação de subunidades livres.

Os testes biológicos foram realizados de acordo com as regulamentações da Farmacopeia Europeia. Em particular, os testes estão relatados na monografia "Menotropina".

A Tabela 9 resume os resultados dos testes analíticos relacionados com a estabilidade e actividade biológica da formulação A. Os valores foram determinados em 4 instantes de verificação: no instante zero, após 1 mês, 3 meses e 6 meses de armazenamento, a uma temperatura de armazenamento de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

TABELA 9

TESTE	INSTANTE ZERO	1 MÊS	3 MESES	6 MESES
Actividade biológica da FSH I.U.	416	420	415	417
Actividade biológica da LH I.U.	276	250	259	270
% Produto oxidado	1,95	1,81	1,95	1,57
% Dímeros/agregados	< 2	< 2	< 2	< 2
% Subunidades livres	< 5	< 5	< 5	< 5

A Tabela 10 resume os resultados dos testes analíticos relacionados com a estabilidade e actividade biológica da formulação B. Os valores foram determinados em 4 instantes de verificação: no instante zero, após 3 meses, 6 meses e 9 meses de armazenamento, a uma temperatura de armazenamento de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

TABELA 10

TESTE	INSTANTE ZERO	3 MESES	6 MESES	9 MESES
Actividade biológica da FSH I.U.	821	850	830	838
Actividade biológica da LH I.U.	570	564	580	622
% Produto oxidado	1,0	0,9	1,0	1,0
% Dímeros/agregados	< 2	< 2	< 2	< 2
% Subunidades livres	< 5	< 5	< 5	< 5

Da TABELA 9 e 10 pode concluir-se que a actividade biológica das formulações A e B está bem conservada após 9

meses de armazenamento. As formulações têm estabilidade elevada.

A estabilidade elevada não é afectada por grandes quantidades de FSH recombinante e LH recombinante.

Sequências

SEQ ID NO: 1: subunidade α glicoproteica humana

SEQ ID NO: 2: subunidade β da hFSH

SEQ ID NO: 3: variante 1 da subunidade β da hFSH

SEQ ID NO: 4: variante 2 da subunidade β da hFSH

SEQ ID NO: 5: variante 3 da subunidade β da hFSH

SEQ ID NO: 6: subunidade β da hLH

Referências

¹Burgues *et al.*; "Subcutaneous self-administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorion gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotropic hypogonadism". *Spanish Collaborative Group on Male Hypogonadotropic Hypogonadism; Hum. Reprod.*; 1997, 12, 980-6;

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

³Keutmann *et al.*; "Structure of human luteinizing hormone beta subunit: evidence for related carboxyl-terminal sequence among certain peptide hormones"; *Biochem. Biophys. 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 genes for the human glycoprotein hormones"; *Recent Prog. Horm. Res.*; 1984, 40, 43-78;

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

⁵Klein *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;

⁶a) 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) Watkins 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*. 12 Dezembro 1995; 166 (2): 335-6; h) Kumar T.R., *et al.*, *Gene*. 12 Dezembro 1995; 166 (2): 333-4;

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

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

⁹Van Hell *et al.*; "Effects of human menopausal gonadotrophin preparations in different bioassay methods"; *Acta Endocrinologica*; 1964, 47, 409-418;

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

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> ARES TRADING SA

<120> Formulações de FSH e variantes da FSH

<130> US 847 Y

<160> 6

<170> PatentIn versão 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 Glu Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile
 1 5 19 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 Glu 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 Glu 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 Met 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

Lisboa, 29 de Dezembro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica líquida compreendendo hormona estimulante do folículo (FSH) ou uma sua variante, bem como um surfactante que é Pluronic® F68, e que também compreende metionina e um agente bacteriostático seleccionado de fenol e m-cresol.
2. Composição farmacêutica líquida compreendendo hormona estimulante do folículo (FSH) ou uma variante e hormona luteinizante (LH) ou uma sua variante, bem como um surfactante que é Pluronic® F68, e que também compreende metionina e um agente bacteriostático seleccionado de fenol e m-cresol.
3. Composição farmacêutica líquida compreendendo hormona luteinizante (LH) ou uma sua variante, bem como um surfactante que é Pluronic® F68, e que também compreende metionina e um agente bacteriostático seleccionado de fenol e m-cresol.
4. Composição farmacêutica líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a hormona estimulante do folículo (FSH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 150 IU/mL até igual a ou cerca de 1200 IU/mL.
5. Composição farmacêutica líquida de acordo com a reivindicação 4, em que a hormona estimulante do folículo (FSH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 300 IU/mL até igual a ou cerca de 900 IU/mL.

6. Composição farmacêutica líquida de acordo com a reivindicação 5, em que a hormona estimulante do folículo (FSH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 600 IU/mL.
7. Composição farmacêutica líquida de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 ou 3, em que a hormona luteinizante (LH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 150 IU/mL até igual a ou cerca de 1200 IU/mL.
8. Composição farmacêutica líquida de acordo com a reivindicação 7, em que a hormona luteinizante (LH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 300 IU/mL até igual a ou cerca de 750 IU/mL.
9. Artigo preparado que compreende uma formulação liofilizada compreendendo hormona estimulante do folículo (FSH) ou uma sua variante, um surfactante que é Pluronic® F68 bem como metionina, em que o artigo preparado também compreende um solvente para reconstituição contendo um agente bacteriostático seleccionado de fenol e m-cresol.
10. Artigo preparado que compreende uma formulação liofilizada compreendendo hormona luteinizante (LH) ou uma sua variante, um surfactante que é Pluronic® F68 bem como metionina, em que o artigo preparado também compreende um solvente para reconstituição contendo um agente bacteriostático seleccionado de fenol e m-cresol.

11. Artigo preparado que compreende uma formulação liofilizada compreendendo hormona estimulante do folículo (FSH) ou uma sua variante bem como hormona luteinizante (LH) ou uma sua variante, um surfactante que é Pluronic® F68 bem como metionina, em que o artigo preparado também compreende um solvente para reconstituição contendo um agente bacteriostático seleccionado de fenol e m-cresol.
12. Artigo preparado de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 até 11, em que a hormona estimulante do folículo (FSH) está presente numa concentração (p/p) igual a ou cerca de 0,1 até 10 µg/mg da formulação total.
13. Artigo preparado de acordo com a reivindicação 12, em que a hormona estimulante do folículo (FSH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 0,3 até 5 µg/mg da formulação total.
14. Artigo preparado de acordo com a reivindicação 13, em que a hormona estimulante do folículo (FSH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 0,37 até 2 µg/mg da formulação total.
15. Artigo preparado de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 até 11, em que a hormona luteinizante (LH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 0,1 até 3 µg/mg da formulação total.
16. Artigo preparado de acordo com a reivindicação 15, em que a hormona luteinizante (LH) está presente numa

- concentração igual a ou cerca de 0,1 até 1 µg/mg da formulação total.
17. Artigo preparado de acordo com a reivindicação 16, em que a hormona luteinizante (LH) está presente numa concentração igual a ou cerca de 0,1 até 0,6 µg/mg da formulação total.
 18. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a hormona estimulante do folículo é hormona estimulante do folículo humana e/ou a hormona luteinizante (LH) é hormona luteinizante (LH) humana.
 19. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com a reivindicação 18, em que a hormona estimulante do folículo é hormona estimulante do folículo humana urinária e/ou a hormona luteinizante (LH) é hormona luteinizante (LH) humana urinária.
 20. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com a reivindicação 18, em que a hormona estimulante do folículo é hormona estimulante do folículo humana recombinante e/ou a hormona luteinizante (LH) é hormona luteinizante (LH) humana recombinante.
 21. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a razão entre FSH e LH está situada no intervalo igual a ou cerca de 6:1 até igual a ou cerca de 1:6.
 22. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com a reivindicação 21, em que a razão entre FSH e LH

está situada no intervalo igual a ou cerca de 4:1 até igual a ou cerca de 1:2.

23. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com a reivindicação 22, em que a razão entre FSH e LH está situada no intervalo igual a ou cerca de 3:1 até igual a ou cerca de 1:1.
24. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com a reivindicação 23, em que a razão entre FSH e LH está situada no intervalo igual a ou cerca de 2:1 até 1:1.
25. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o agente bacteriostático é m-cresol.
26. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com a reivindicação 25, compreendendo m-cresol numa concentração igual a ou cerca de 0,3% (massa/massa do solvente).
27. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, que também compreende sucrose.
28. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, que também compreende um tampão de fosfato a um pH igual a ou cerca de 6,0 até igual a ou cerca de 8,0.

29. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com a reivindicação 28, que também compreende um tampão de fosfato a um pH igual a ou cerca de 7,0.
30. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com a reivindicação 29, que compreende os ingredientes seguintes: rFSH, Pluronic® F68, sucrose, metionina, *m*-cresol e um tampão aquoso de fosfato a um pH igual a ou cerca de 7,0.
31. Composição farmacêutica ou artigo preparado de acordo com a reivindicação 30, em que a rFSH está presente numa concentração igual a ou cerca de 600 IU/mL, o Pluronic® F68 está presente numa concentração igual a ou cerca de 0,1 mg/mL, a sucrose está presente numa concentração igual a ou cerca de 60 mg/mL, a metionina está presente numa concentração igual a ou cerca de 0,1 mg/mL, o *m*-cresol está presente numa concentração igual a ou cerca de 3 mg/mL e o tampão de fosfato está numa concentração igual a ou cerca de 10 mM em fosfato.
32. Artigo preparado de acordo com a reivindicação 11, que compreende 32,75 µg de FSH recombinante, 9,0 µg de LH recombinante, 15,0 mg de sucrose, 0,052 mg de NaH₂PO₄ H₂O, 0,825 mg de Na₂HPO₄ 2H₂O, 0,05 mg de Pluronic® F68 e 0,05 mg de L-metionina.
33. Artigo preparado de acordo com a reivindicação 11, que compreende 65,5 µg de FSH recombinante, 18,0 µg de LH recombinante, 30,0 mg de sucrose, 0,104 mg de NaH₂PO₄ H₂O, 1,65 mg de Na₂HPO₄ 2H₂O, 0,10 mg de Pluronic® F68 e 0,10 mg de L-metionina.

34. Método de preparação de uma composição farmacêutica, que compreende o passo de formar uma solução de FSH, um surfactante que é Pluronic® F68 e um diluente líquido, e também adicionar metionina e um agente bacteriostático seleccionado de fenol e m-cresol.

35. Método de preparação de uma composição farmacêutica embalada, que compreende colocar uma solução compreendendo FSH, um surfactante que é Pluronic® F68 e também colocar metionina e um agente bacteriostático seleccionado de fenol e m-cresol num frasco, ampola ou cartucho.

36. Método de preparação de um artigo preparado de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 até 11, que compreende o passo de formar uma mistura de FSH com ou sem LH, ou LH isoladamente, bem como um surfactante que é Pluronic® F68, adicionar metionina e sujeitar a mistura a uma liofilização, e proporcionar um solvente para reconstituição contendo um agente bacteriostático seleccionado de fenol e m-cresol.

Lisboa, 29 de Dezembro de 2010

Figura 1

