



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0818324-4 B1



(22) Data do Depósito: 29/10/2008

(45) Data de Concessão: 24/12/2019

(54) Título: FORMULAÇÃO LÍQUIDA CONTENDO HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH) OU UMA VARIANTE DO MESMO, SEU USO, SUA FORMA DE APRESENTAÇÃO, PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 9/08; A61K 38/24; A61P 5/06.

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2007 EP 07 119832.9; 28/11/2007 US 61/004,481.

(73) Titular(es): MERCK SERONO S.A..

(72) Inventor(es): RITA AGOSTINETTO; FABRIZIO SAMARITANI; ALESSANDRA DEL RIO; JOEL RICHARD.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008064679 de 29/10/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/056569 de 07/05/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/04/2010

(57) Resumo: FORMULAÇÃO LÍQUIDA CONTENDO HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH) OU UMA VARIANTE DO MESMO, SEU USO, SUA FORMA DE APRESENTAÇÃO, PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA A invenção refere-se às formulações farmacêuticas líquidas de hormônio luteinizante (LH) para administração única ou de multidoses.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "FORMULAÇÃO LÍQUIDA CONTENDO HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH) OU UMA VARIANTE DO MESMO, SEU USO, SUA FORMA DE APRESENTAÇÃO, PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA".

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se ao campo de formulações farmacêuticas líquidas de hormônio luteinizante (LH), como também métodos de produção de tais formulações.

Antecedentes da invenção

[002] Hormônio luteinizante (LH), hormônio estimulante do folículo (FSH) e a gonadotrofina coriônica (CG) são proteínas injetáveis da classe das gonadotrofinas. LH, FSH e CG que são utilizados isoladamente ou em combinação para o tratamento da infertilidade e transtornos reprodutivos em pacientes femininos e masculinos.

[003] Na natureza, FSH e LH são produzidos pela glândula pituitária. Para uso farmacêutico, FSH e LH e suas variantes podem ser produzidos recombinantemente (rFSH e RLH), ou podem ser produzidos a partir da urina de mulheres em pós-menopausa (uFSH e ULH).

[004] FSH é utilizado em pacientes do sexo feminino na indução da ovulação (IO) e em hiperestimulação ovariana controlada (HOC) para tecnologias de reprodução assistida (TRA). Em um regime de tratamento típico para indução da ovulação, é administrado a paciente injeções diárias de FSH ou uma variante de FSH (cerca de 75 a 300 UI de FSH / dia) por um período de cerca de 6 a 12 dias. Em um regime de tratamento típico de hiperestimulação ovariana controlada, é administrado a um paciente injeções de FSH ou uma variante de FSH (cerca de 150-600 UI de FSH / dia) por um período de cerca de 6 a 12 dias.

[005] FSH também é usado para induzir a espermatogênese em

homens que sofrem de oligospermia. Um regime com 150 UI de FSH 3 vezes por semana, em combinação com 2'500 UI hCG duas vezes por semana, foi bem-sucedido em conseguir uma melhora na contagem de espermatozoides nos homens que sofrem de hipogonadismo hipogonadotrófico (Burgues et al., 1997).

[006] LH é utilizado em pacientes do sexo feminino, em combinação com FSH em IO e COH, particularmente naquelas pacientes com níveis muito baixos de LH endógeno ou resistência ao LH, como as mulheres que sofrem de hipogonadismo hipogonadotrófico (grupos HH, OMS I) ou as pacientes mais idosas (isto é, 35 anos ou mais idosas), e pacientes em que a implantação do embrião ou início de aborto é um problema. LH em combinação com FSH tem sido tradicionalmente disponíveis numa preparação chamada gonadotrofinas para menopausa humana (hMG), extraído da urina de mulheres pós-menopáusicas. hMG tem uma razão de 1:1 de atividade FSH: LH.

[007] CG atua no mesmo receptor que LH e provoca as mesmas respostas. CG tem uma média de vida de circulação mais longa do que LH e, portanto, é comumente usada como uma fonte de atuação longa da atividade de LH. CG é usada em regimes de IO e COH para imitar o pico de LH natural e iniciar a ovulação. Uma injeção de gonadotrofina coriônica humana (hCG) é utilizada para disparar a ovulação no final da estimulação com FSH ou uma mistura de FSH e LH. CG pode também ser usada em conjunto com FSH durante o estímulo para IO e COH, a fim de proporcionar uma atividade de LH durante a estimulação em pacientes em que a atividade do LH é desejável, tal como aquelas mencionadas acima.

[008] FSH, LH e CG são membros do heterodímero, da família do hormônio da glicoproteína, que também inclui o hormônio estimulador da tireoide (TSH). Os membros desta família são heterodímeros, compreendendo uma subunidade α e outra β . As subunidades são manti-

das juntas por interações não covalentes. O heterodímero humano FSH (hFSH) consiste em (i) uma subunidade alfa glicoproteína de 92 aminoácidos maduros que também é comum aos outros membros da família humana (isto é, a gonadotrofina coriônica ("CG"), hormônio luteinizante ("LH") e hormônio estimulador da tireoide (TSH), e (ii) uma subunidade beta de 111 aminoácidos maduros que é única para FSH (Shome et al., 1974 e 1988). O heterodímero LH humano consiste em (i) uma subunidade de alfa glicoproteína de 92 aminoácidos maduros, e (ii) uma subunidade beta de 112 aminoácidos madura que é única para LH (Keutmann et al., 1979; Talmadge et al., 1984; Fiddes & Talmadge, 1984). As subunidades alfa e beta de glicoproteínas podem ser propensas a se dissociar em formulações, devido à interação com um conservante, tensoativo e outros excipientes. A dissociação das subunidades leva à perda da atividade biológica (Reichert & Ramsey, 1975).

[009] FSH é formulado para injeção intramuscular (IM) ou subcutânea (SC). FSH é fornecido em forma liofilizada (sólida) em frascos ou ampolas de 75 IU / frasco e 150 IU / frasco com uma vida útil de cerca de dois anos, quando armazenadas a 2-25° C. A solução para injeção é formada por reconstituição do produto liofilizado com água para injeção (WFI). Para a indução da ovulação ou hiperestimulação ovariana controlada, são recomendadas injeções diárias começando com doses de 75 UI a 600 UI por até cerca de dez dias. Dependendo da resposta da paciente, até três ciclos de tratamento com doses crescentes de FSH podem ser usados. Com formulações liofilizadas, é requerido à paciente reconstituir um novo frasco de material liofilizado com diluente e administrá-lo imediatamente após a reconstituição em uma base diária [Pacote de inserção N1700101 A, publicado em fevereiro de 1996, para Fertinex™ (urofolitropina para injeção, purificada) para injeção subcutânea, por Serono Laboratories, Inc., Randolph,

MA].

[0010] FSH também foi formulado, em ambos os formatos líquido em dose única e multidoses, em frascos ou ampolas. Formatos de dose única devem permanecer estáveis e ativos no armazenamento antes do uso.

[0011] Formatos de multidoses não só devem permanecer estáveis e ativos no armazenamento antes do uso, mas também devem permanecer estáveis, ativos e relativamente livres de bactérias durante o período de vários dias de administração, após o selo da ampola ter sido comprometido. Por esta razão, os formatos de multidoses contêm muitas vezes um agente bacteriostático.

[0012] LH é formulado para injeção intramuscular (IM) ou subcutânea (SC). LH é fornecido em forma liofilizada (sólida) em frascos ou ampolas de 75 IU / frasco com uma vida útil de cerca de dois anos, quando armazenadas a 2-25° C. Uma solução para injeção é formada por reconstituição do produto liofilizado com água para injeção (WFI). Para a indução de ovulação ou hiperestimulação ovariana controlada, em conjunção com o FSH, são recomendadas injeções diárias com doses de partida de 75 UI a 600 UI de LH por até cerca de dez dias.

[0013] EP 0 618 808 (Applied Research Systems ARS Holding NV) descreve uma composição farmacêutica compreendendo uma mistura íntima sólida de gonadotropina e uma quantidade estabilizante de sacarose sozinha ou em combinação com glicina.

[0014] EP 0 814 841 (Applied Research Systems ARS Holding NV) descreve uma composição farmacêutica líquida estável compreendendo gonadotrofina coriônica humana recombinante (hCG) e uma quantidade de estabilização de manitol.

[0015] WO 2004/087213 (Ares Trading SA) descreve um líquido e uma composição farmacêutica de congelamento-dissecação compreendendo hormônio estimulante de folículo (FSH) ou uma variante do

mesmo, e/ou hormônio luteinizante (LH) ou uma variante do mesmo como também um tensoativo selecionado de Pluronic ® F77, Pluronic F87, Pluronic F88 e Pluronic F68.

[0016] WO 2004/112826 (Ares Trading SA) descreve uma formulação compreendendo hormônio estimulante de folículo (FSH) ou uma variante do mesmo e/ou hormônio luteinizante (LH) ou uma variante do mesmo, como também um tensoativo selecionado a partir de um polissorbato incluindo Polissorbato 20, Polissorbato 40 e Polissorbato 80.

[0017] WO 00/04913 (Eli Lilly and Co.) descreve uma formulação compreendendo FSH ou uma variante de FSH contendo uma subunidade alfa e beta, e um conservante selecionado do grupo consistindo em fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, álcool benzílico, alquilparabeno (metila, etila, propila, butila e similares), cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, deidroacetato de sódio e timerosal, ou misturas dos mesmos em um diluente aquoso.

[0018] WO 2004/105788 (Ferring BV) descreve uma composição farmacêutica consistindo em FSH e hCG em pelo menos um veículo farmacêutico aceitável.

[0019] EP 0 448 146 (AKZO NV) descreve um liofilizado contendo gonadotropina estabilizada compreendendo uma gonadotropina e uma quantidade estabilizante de uma quantidade de sal de ácido dicarboxílico.

[0020] EP 0 853 945 (Akzo Nobel NV) descreve uma formulação contendo gonadotropina líquida caracterizada pelo fato de que formulação compreende uma gonadotrofina e quantidades estabilizantes de um ácido policarboxílico ou um sal do mesmo e de um composto tioéter.

[0021] Há ainda a necessidade de formulações líquidas estáveis de LH ou uma variante de LH de administração em dose única ou multidoses.

Sumário da invenção

[0022] É um objetivo da invenção prover formulações líquidas de LH ou variante de LH, métodos para a preparação delas, e métodos para seu uso farmacêutico ou veterinário no tratamento de distúrbios da fertilidade.

[0023] Em um primeiro aspecto, a invenção provê uma formulação líquida de LH ou uma variante de LH compreendendo uma preparação purificada de LH ou variante de LH, e uma quantidade de estabilização de arginina ou sais da mesma e / ou lisina ou sais da mesma.

[0024] Em um segundo aspecto, a invenção provê um método para a preparação de uma formulação líquida de LH ou variante de LH compreendendo as etapas de: a) formação de uma solução de LH ou variante de LH, e b) adicionar à dita solução uma quantidade estabilizadora de arginina ou sais da mesma e / ou lisina ou sais da mesma.

[0025] Em um terceiro aspecto, a invenção provê uma forma de apresentação de uma formulação líquida de LH ou variante de LH compreendendo formulação líquida de acordo com a invenção, hermeticamente vedada sob condições estéreis em um recipiente apropriado para o armazenamento antes do uso. O recipiente pode ser uma ampola, um frasco, uma seringa, ou um cartucho.

[0026] Em um quarto aspecto, a invenção provê um artigo de preparação para uso farmacêutico humano, compreendendo material de embalagem e um recipiente compreendendo formulação líquida de LH ou variante de LH de acordo com a invenção, e um agente bacteriostático, em que o dito material de embalagem compreende um rótulo que indica que tal formulação pode ser mantida durante um período de vinte e oito dias ou mais após o primeiro uso.

[0027] É um objetivo adicional da invenção, prover o uso de uma formulação líquida de LH ou variante de LH de acordo com a invenção em combinação com formulações líquidas de FSH ou variante de FSH.

Breve descrição dos desenhos

[0028] A figura 1 mostra a comparação dos perfis cromatográficos (por SE-HPLC) de formulações r-hLH com recipientes de concentrações diferentes (6, 12 e 24 µg/ml de r-hLH), (seringa e cartucho) e os volumes de enchimento (0,25, 0,5 e 1 ml). Estas formulações, em adição a r-hLH, contêm tampão de fosfato, sacarose, Polissorbato 20, metionina, álcool de benzila, cloreto de benzalcônio e água para injeção. As linhas cinzas correspondem a um volume de enchimento de 0,25 ml; as linhas pontilhadas correspondem a um volume de enchimento de 0,5 ml, e as linhas pretas a um volume de enchimento de 1 ml. (A) formulação de 6 µg/ml de r-hLH em seringa. (B) formulação de 6 µg/ml de r-hLH em cartucho. (C) formulação de 12 µg/ml de r-hLH em seringa. (D) formulação de 12 µg/ml de r-hLH em cartucho. (E) formulação de 24 µg/ml de r-hLH em seringa. (F) formulação de 24 µg/ml de r-hLH em cartucho. Os picos em um tempo de retenção de 8,5 minutos correspondem a heterodímeros intactos (subunidades alfa+beta ligadas através de uma ligação não-covalente), enquanto picos de tempo de retenção mais alto (cerca de 9,5 minutos) correspondem a subunidades livres. AU: a unidade de absorção.

[0029] A figura 2 mostra a comparação do percentual de heterodímeros calculados pelo SE-HPLC na formulação com e sem a combinação de agentes bacteriostáticos, respectivamente SAC/500/24µgBACL_cart e SAC/500/24µg_cart. (A) SE-HPLC feita depois de três dias (3d) com o armazenamento a +40° C. (B), SE-HPLC realizada após oito dias (8d), quatro semanas (4s), seis semanas (6s), oito semanas (8s) e treze semanas (13s) com o armazenamento a +33° C.

Descrição detalhada da invenção

[0030] As formulações líquidas de LH da presente invenção têm propriedades melhoradas ou mais apropriadas ou estabilidade, e são

úteis para o tratamento da infertilidade em mulheres e / ou homens.

[0031] Em uma modalidade preferida as formulações líquidas da invenção são para injeção subcutânea e / ou intramuscular.

[0032] As propriedades apropriadas ou a estabilidade das formulações líquidas de LH ou variante de LH, de acordo com a invenção, são obtidas impedindo ou reduzindo a perda de atividade ou de estabilidade, ou por melhorar qualquer aspecto da eficácia ou conveniência da administração, por exemplo, pelo menos um entre modo, frequência, dose, conforto, facilidade de uso, e similares.

[0033] Hormônio luteinizante ou LH, como aqui utilizado refere-se ao LH produzido como uma proteína madura por inteiro, que inclui, mas não está limitado a LH humano ou "hLH", produzidos recombinantemente ou isolados de fontes humanas, como a urina de mulheres em pós-menopausa.

[0034] A expressão "variante de LH" se destina a abranger as diferentes moléculas na sequência de aminoácidos, o padrão de glicosilação ou em articulação intersubunidade do LH humano, mas que exibem atividade LH.

[0035] O termo "atividade" em relação ao LH, refere-se à capacidade de uma formulação de LH ou uma fórmula mista, de provocar reações biológicas associadas com LH, como o método de ganhar peso na vesícula seminal (Hell Van et al., 1964). A atividade biológica do LH é avaliada em relação a um padrão aceito para LH.

[0036] A medida da atividade é expressa em Unidades Internacionais por mililitro de solução (UI / ml) ou em Mega Unidades Internacionais por mililitro de solução (MUI / ml). (1 MUI / ml = 1000000 UI / ml). Uma Unidade Internacional é calculada conforme descrito na Research Reference Reagent Note No. 35, publicada pelo National Institute of Health, Bethesda, Maryland.

[0037] LH ou variante de LH pode ser produzido por qualquer mé-

todo adequado, como recombinantemente, pelo isolamento ou purificação de fontes naturais como pode ser o caso, ou por síntese química, ou qualquer combinação dos dois.

[0038] O uso do termo "recombinante" refere-se a preparações de LH ou uma variante de LH que são produzidos através da utilização da tecnologia do DNA recombinante (ver, por exemplo WO 85/01958). Um exemplo de um método de expressar LH usando a tecnologia recombinante é a transfecção de células eucarióticas com as sequências de DNA que codifica uma subunidade alfa e beta do LH, seja fornecido em um vetor ou em dois vetores com cada subunidade com um promotor separados, conforme descrito nas patentes Europeias de nºs EP 0 211 894 e EP 0 487 512.

[0039] Outro exemplo do uso da tecnologia recombinante para a produção de LH é o uso da recombinação homóloga para inserir um segmento de regulação heterólogo em conexão operativa a sequências de codificação endógenas das subunidades de LH, como descrito na patente europeia Nº. EP 0 505 500 (Applied Research Systems ARS Holding NV).

[0040] Hormônio folículo estimulante, ou FSH, como aqui utilizado refere-se ao FSH produzido como uma proteína madura inteira, que inclui, mas não está limitado a FSH humana ou "hFSH", produzidos recombinante ou isoladamente de fontes humanas, como a urina das mulheres em pós-menopausa.

[0041] A expressão "variante de FSH" destina-se a incluir essas moléculas diferentes na sequência de aminoácidos, padrão de glicosilação ou em articulação intersubunidade da FSH humana, mas que exibem atividade FSH.

[0042] O termo "atividade" em relação ao FSH, refere-se à capacidade de uma formulação de FSH ou uma fórmula mista, de fazer surgirem reações biológicas associadas com FSH, como ganho de peso

ovariano no ensaio de Steelman-Pohley (Steelman et al., 1953), ou crescimento folicular em um paciente do sexo feminino. O crescimento folicular em uma paciente do sexo feminino pode ser avaliado por ultrassom, por exemplo, em termos do número de folículos tendo um diâmetro médio de menos ou cerca de 16 mm no 8º dia de estimulação. A atividade biológica é avaliada com relação a um padrão aceito para FSH.

[0043] Exemplos de variante de FSH incluem CTP-FSH, uma recombinante de FSH modificada de longa atividade, que consiste em uma subunidade do tipo α selvagem e uma subunidade β híbrida em que o peptídeo de terminal carbóxi de hCG foi fundido ao terminal C da subunidade β de FSH, como descrito em LaPolt et al. (1992) ou em Klein et al. (2003). Também incluída está uma cadeia única CTP-FSH, uma molécula de cadeia única, que consiste nas seguintes sequências (do terminal N até o terminal C):

β FSH	β hCG-CTP(113-145)	α FSH
-------------	--------------------------	--------------

em que β FSH significa a subunidade β de FSH, β hCG CTP (113-145) significa o peptídeo carbóxi terminal de hCG e α FSH significa a subunidade α de FSH, conforme descrito por Klein et al. (2002). Outros exemplos de variantes de FSH incluem moléculas de FSH tendo locais de glicosilação adicionais incorporados na subunidade α e/ou subunidade β , como descrito em WO 01/58493 (Maxygen), particularmente, tal como descrito nas reivindicações 10 e 11 de WO 01/58493, e moléculas de FSH com ligações intersubunidades S-S, como descrito em WO 98/58957.

[0044] FSH ou variante de FSH pode ser produzida por qualquer método adequado, tal como recombinantemente, pelo isolamento ou purificação de fontes naturais como pode ser o caso, ou por síntese química, ou qualquer combinação dos mesmos.

[0045] O FSH ou variante de FSH utilizado de acordo com a pre-

sente invenção podem ser produzidos não somente através de meios recombinantes, incluindo a partir de células de mamíferos, mas também pode ser purificado a partir de outras fontes biológicas, como a partir de fontes urinárias. Metodologias aceitáveis incluem aquelas descritas em Hakola et al. (1997), Keene et al. (1989), Cerpa-Poljak ETAL (1993), Dias et al. (1994); Flack et al.(1994), Valove et al. (1994), Patente U.S. 3.119.740 e Patente U.S. nº 5.767.067.

[0046] O termo "administrar" ou "administração" significa introduzir uma formulação da presente invenção no corpo de um paciente que dela necessita para tratar uma doença ou condição.

[0047] O termo "paciente" significa um mamífero que é tratado por uma doença ou condição. Os pacientes são da, porém não limitados a, origem a seguir, humana, ovino, suíno, equino, bovino, coelho e similares.

[0048] O termo "diluyente aquoso" refere-se a um solvente líquido que contém água. Sistemas de solventes aquosos podem consistir somente em água, ou podem consistir em água mais um ou mais solventes miscíveis, e pode conter solutos dissolvidos tais como açúcares, tampões, sais e outros excipientes. Os solventes não aquosos mais comumente usados são os alcoóis orgânicos de cadeia curta, como metanol, etanol, propanol, cetonas de cadeia curta, como acetona e polialcoóis, tais como glicerol.

[0049] Um "agente de isotonicidade" é um composto que é fisiologicamente tolerado e confere uma tonicidade adequada para uma formulação a fim de impedir o fluxo de rede de água através de todas as membranas de células que estão em contato com a formulação.

[0050] Compostos como glicerina, são comumente usados para tais propósitos, em concentrações conhecidas. Outros agentes de isotonicidade apropriados incluem, mas não estão limitados a, aminoácidos ou proteínas (por exemplo, glicina ou albumina), sais (por exem-

plo, cloreto de sódio) e açúcares (por exemplo, dextrose, sacarose e lactose).

[0051] O termo "bacteriostático" ou "agente bacteriostático" refere-se a um composto ou composições adicionadas a uma formulação para atuar como um agente antibacteriano. Um LH ou variante de LH preservada contendo formulação da presente invenção preferencialmente atende às diretrizes legais ou regulamentares para a eficácia de conservante para ser um produto de multiuso comercialmente viável, de preferência em seres humanos.

[0052] Exemplos de bacteriostáticos incluem fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, álcool de benzila, alquilparabeno (metila, etila, propila, butila e similares), cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, deidroacetato de sódio e timerosal.

[0053] O termo "tampão" ou "tampão fisiologicamente aceitável" refere-se a soluções de compostos que são conhecidas por serem seguras para uso farmacêutico ou veterinário em formulações, e que têm o efeito de manter ou controlar o pH da formulação na faixa de pH desejada para formulação. Tampões aceitáveis para o controle de pH em um meio de pH moderadamente ácido a um pH moderadamente básico incluem, mas não estão limitados a, compostos como fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina. "TRIS" refere-se a 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol e a qualquer sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Tampões preferíveis são tampões de fosfato com solução salina ou um sal aceitável.

[0054] O termo "tampão de fosfato" refere-se a soluções contendo ácido fosfórico ou seus sais, ajustadas ao pH desejado. Geralmente tampões de fosfato são preparados a partir de ácido fosfórico, ou um sal de ácido fosfórico, incluindo, mas não limitado a sais de sódio e potássio. Vários sais de ácido fosfórico são conhecidos na técnica, tais como sais de ácido de sódio e potássio monobásico, dibásico, tribási-

co. Sais de ácido fosfórico também são conhecidos por ocorrerem como hidratos do sal de ocorrência. Tampões de fosfato podem abranger uma gama de pHs, tais como pH de cerca de 4 até pH 10, e intervalos de preferência de cerca de pH 5 a cerca de pH 9, e o mais preferido de cerca de 7,5 a cerca de 8,5 ou menos, preferencialmente em ou a cerca de pH 8,0.

[0055] O termo "frasco" ou "recipiente" refere-se amplamente a um reservatório apropriado para reter LH e diluente em um estado estéril contido. Exemplos de um frasco usado aqui no presente incluem ampolas, cartuchos, embalagens de ampola ou de tal reservatório apropriado para a entrega do LH para o paciente através de seringa, bomba (incluindo osmótica), cateter, adesivos transdérmicos, *spray* pulmonar ou transmucosal. Frascos apropriados para acondicionamento dos produtos para a administração parenteral, pulmonar, transmucosal, ou transdérmica são bem-conhecidos e reconhecidos na técnica.

[0056] O termo "estabilidade" refere-se à estabilidade física, química e conformacional de LH nas formulações da presente invenção (incluindo a manutenção da atividade biológica). A instabilidade de uma formulação de proteína pode ser causada por degradação ou agregação química de moléculas de proteína para formar polímeros de ordem superior, através da dissociação dos heterodímeros em monômeros, desglicosilação, modificação de glicosilação, oxidação (particularmente da subunidade α) ou qualquer outra modificação estrutural que reduz, pelo menos, uma atividade biológica de um polipeptídeo de LH incluído na presente invenção.

[0057] Uma solução ou formulação "estável", é uma em que o grau de degradação, modificação, agregação, perda de atividade biológica e similares, de proteínas naquele lugar é controlada de maneira aceitável, e não aumenta de maneira inaceitável com o tempo. Preferencialmente formulação mantém, pelo menos ou cerca de 80% da ativid-

de de LH rotulada durante um período de 6 meses a uma temperatura de ou cerca de 1-10° C, mais preferencialmente de ou cerca de 2-8° C, mais preferencialmente de ou cerca de 4-5° C. A atividade de LH pode ser medida utilizando o bioensaio⁶ de ganho de peso das vesículas seminiais.

[0058] O termo "tratar" refere-se à administração, acompanhamento, gestão e/ou cuidado de um paciente para o qual a administração de LH é desejável com o propósito de estimulação de folículo ou testicular ou de qualquer outra resposta fisiológica regulada por LH. O tratamento, dessa maneira, pode incluir, mas não está limitado a, a administração de LH para a indução ou a melhoria da qualidade do esperma, estimulação da liberação de testosterona no homem, ou desenvolvimento folicular ou para indução da ovulação na mulher.

[0059] A expressão "uso de multidoses" é destinada a incluir o uso de uma única ampola, frasco, ou cartucho de uma formulação de LH para mais de uma injeção, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais injeções. As injeções são feitas preferencialmente durante um período de pelo menos cerca de 12 horas, 24 horas, 48 horas, etc, preferencialmente até um período de menos ou cerca de 28 dias.

[0060] As injeções podem ser espaçadas no tempo, por exemplo, por um período de 6, 12, 24, 48 ou 72 horas.

[0061] Um "sal" de uma proteína é um ácido ou sal de adição de base. Esses sais são formados, preferencialmente entre um ou mais dos grupos carregados na proteína e um ou mais cátions ou ânions fisiologicamente aceitáveis, não-tóxicos. Sais orgânicos e inorgânicos incluem, por exemplo, aqueles preparados a partir de ácidos como o clorídrico, sulfúrico, sulfônico, tartárico, fumárico, bromídrico, glicólico, cítrico, maleico, fosfórico, succínico, acético, nítrico, benzoico, ascórbico, p-toluenossulfônico, benzenossulfônico, naftalenossulfônico, propiônico, carbônico, e similares, ou por exemplo, amônio, sódio, potás-

sio, cálcio ou magnésio.

[0062] Descobriu-se que um aminoácido selecionado do grupo da arginina, lisina, ou uma mistura ou um sal das mesmas é um agente estabilizador apropriado para a preparação de uma formulação líquida estável compreendendo LH. Dessa maneira, o primeiro aspecto da invenção refere-se a uma formulação de gonadotropina líquida contendo hormônio luteinizante (LH) ou uma variante da mesma caracterizada pelo fato de que a dita formulação compreende uma quantidade de estabilizante de arginina ou sais da mesma e/ou lisina ou sais da mesma.

[0063] A quantidade estabilizante de arginina ou sais da mesma e/ou lisina ou sais da mesma presentes na formulação líquida está em uma concentração de ou cerca de 10 até em ou cerca de 150 mg / ml da composição total, mais preferivelmente em ou cerca de 20 até em ou cerca de 60 mg/ml.

[0064] Preferencialmente a concentração de arginina ou de sais da mesma está em ou cerca de 10 mg/ml até em ou cerca de 50 mg/ml, de preferência em ou cerca de 20 mg/ml até em ou cerca de 40 mg/ml, mais particularmente preferentemente em ou cerca de 25 mg/ml até em ou cerca de 35 mg/ml, mais preferivelmente em ou cerca de 31,5 mg/ml.

[0065] Preferencialmente a concentração de lisina ou seus sais está em ou cerca de 10 mg/ml até em ou cerca de 50 mg/ml, de preferência em ou cerca de 20 mg/ml até em ou cerca de 40 mg/ml, mais particularmente, de preferência em ou cerca de 25 mg/ml até em ou cerca de 35 mg/ml, mais preferencialmente ainda em ou cerca de 28,5 mg/ml.

[0066] O hormônio luteinizante (LH) dentro da formulação líquida está de preferência presente em uma concentração igual ou cerca de 1 até cerca de 50 µg/ml da formulação total.

[0067] Em uma modalidade, o hormônio luteinizante (LH) está presente numa concentração de ou cerca de 1 a 15 microgramas/ml da composição total, em especial quando destinados ao uso único. Em uma modalidade adicional, o hormônio luteinizante (LH) está presente numa concentração igual ou cerca de 15 a 30 µg/ml da composição total, em particular quando destinado ao uso múltiplo (multidoses).

[0068] A concentração de LH na formulação é de preferência de ou cerca de 20 IU/ml ou em cerca de 2.000 IU/ml, mais preferivelmente em ou cerca de 50 até em ou cerca de 1.000 IU/ml, mais particularmente preferivelmente em ou cerca de 100 IU/ml até em ou cerca de 600 IU/ml.

[0069] Preferencialmente o LH é produzido recombinantemente, particularmente preferível é produzido em células do ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com um vetor ou vetores de expressão compreendendo DNA codificando para a subunidade alfa da glicoproteína humana e a subunidade beta do LH. DNA codificando as subunidades alfa e beta pode estar presente nos mesmos ou em diferentes vetores.

[0070] LH recombinante tem diversas vantagens sobre suas contrapartidas urinárias. Técnicas de cultura e de isolamento, usando células recombinantes permitem consistência entre as bateladas. Em contraste, a LH urinária varia grandemente de batelada para batelada em tais características como pureza, padrão de glicosilação, sialilação e oxidação das subunidades. Devido à maior consistência de batelada para batelada e pureza do LH recombinante, os hormônios podem ser prontamente identificados e quantificados usando técnicas tais como focalização isoelétrica (IEF). A facilidade com que LH recombinante pode ser identificado e quantificado permite o enchimento de frascos através de massa de hormônio (preencher com massa) em vez de encher por bioensaio.

[0071] De preferência as formulações líquidas da presente invenção têm um tampão, de preferência um tampão de fosfato, com contra-íons preferidos sendo íons de sódio ou de potássio. Tampões de solução salina de fosfato são bem-conhecidos na técnica, tal como a solução salina tamponada de Fosfato Dulbecco. Concentrações de tampão da solução total podem variar entre em ou cerca de 1mM, 5mM, 9,5 mM, 10mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM, e 500mM. Preferivelmente, a concentração do tampão é em ou cerca de 10mM. Particularmente preferido é um tampão de 10 mM em íons fosfato com um pH de ou cerca de 8,0.

[0072] Preferivelmente, o tampão é ajustado de tal forma que as formulações líquidas da presente invenção têm um pH entre ou a cerca de 7,0 e em ou cerca de 9,0, mais preferivelmente em ou cerca de 7,5 até em ou cerca de 8,5, incluindo cerca de pH 7,8, pH 8,0 e 8.2. A invenção é dirigida para formulações líquidas de LH ou variante de LH que podem ser de dose única ou multidoses.

[0073] Estas formulações líquidas de LH da invenção, que são destinadas ao uso de múltiplas doses, compreendem um agente bacteriostático, como o fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, álcool de benzila, alquilparabeno (metila, etila, propila, butila e similares), cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, deidroacetato de sódio e timerosal. Preferidos são o álcool de benzila de benzila, fenol, e combinação de álcool de benzila de benzila e cloreto de benzalcônio. O agente bacteriostático é usado em uma quantidade que irá render uma concentração que é eficaz para manter formulação essencialmente livre de bactérias (apropriado para a injeção) durante o período de injeção de multidoses, que pode ser de 12 ou 24 horas em ou cerca de 12 ou 14 dias, preferivelmente, cerca de 6 até em ou cerca de 28 dias.

[0074] O agente bacteriostático está presente preferencialmente em uma concentração de até em ou cerca de 0,005 até em ou cerca

de 15 mg/ml, mais preferivelmente em ou cerca de 0,01 até em ou cerca de 12 mg / ml. O agente bacteriostático está preferencialmente presente em uma concentração de ou cerca de 0,1% (massa bacteriostática / massa de solvente) até em ou cerca de 2,0%, mais preferivelmente até em ou cerca de 0,2% até em ou cerca de 1,0%.

[0075] No caso do álcool de benzila de benzila, particularmente preferida é uma concentração de 0,9% ou 1,2%. No caso de fenol, particularmente preferido é em ou cerca de 0,5%. No caso da combinação de álcool de benzila e cloreto de benzalcônio, particularmente preferida é uma concentração de 0,3% e 0,001%, respectivamente.

[0076] Preferencialmente as formulações da invenção contêm um antioxidante, tal como metionina, bissulfito de sódio, sais de ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA), hidroxitolueno butilado (BHT) e anisol hidroxi anisol butilado (BHA). O mais preferido é metionina. O antioxidante previne a oxidação de LH (em especial a subunidade- α).

[0077] O antioxidante, por exemplo metionina, está preferivelmente presente em uma concentração de em ou cerca de 0,01 até em ou cerca de 5,0 mg/ml, mais preferivelmente em ou ou cerca de 0,05 até em ou cerca de 0,5 mg/ml.

[0078] Preferivelmente as formulações da invenção contêm um tensoativo. Preferivelmente, o tensoativo é selecionado do grupo de polissorbatos, em particular Polissorbato 20 (monolaurato de polioxietileno (20) de sorbitano), Polissorbato 40 (monopalmitato de sorbitano (20) de polioxietileno) e Polissorbato 80 (mono-oleato de sorbitano (20) de polioxietileno). Mais preferido é Polissorbato 20, preferivelmente em uma concentração de em ou cerca de 0,01 até em ou cerca de 10 mg/ml.

[0079] Em uma modalidade preferida, as formulações da invenção compreendem pelo menos 25 μ g/ml de r-hLH, 1,65 mg/ml de Na_2HPO_4 $2\text{H}_2\text{O}$, 0,104 mg/ml de NaH_2PO_4 H_2O , 31,5 mg/ml de monoclórato de

arginina, 0,05 mg/ml de Polissorbato 20, 0,5 mg/ml de metionina e 5 mg/ml de fenol.

[0080] Em outra modalidade preferida, as formulações da invenção compreendem pelo menos 25 µg/ml de r-hLH, 1,65 mg/ml de Na₂HP0₄ 2H₂O, 0,104 mg/ml de NaH₂PO₄ H₂O, 28,5 mg/ml de monoclórato de lisina, 0,05 mg/ml de Polissorbato 20, 0,5 mg/ml de metionina e 12 mg/ml de álcool de benzila.

[0081] Em outra modalidade preferida, as formulações da invenção compreendem pelo menos 25 µg/ml de r-hLH, 1,65 mg/ml de Na₂HP0₄ 2H₂O, 0,104 mg/ml de NaH₂PO₄ H₂O, 28,5 mg/ml de monoclórato de lisina, 0,05 mg/ml de Polissorbato 20, 0,5 mg/ml de metionina, 3 mg/ml de álcool de benzila e 0,01 mg/ml de cloreto de benzalcônio.

[0082] Em uma modalidade preferida, a invenção provê uma composição farmacêutica líquida, para uso em multidoses, incluindo LH ou variante de LH, um agente estabilizador selecionado do grupo da arginina, lisina, ou uma mistura ou um sal do mesmo, e um agente bacteriostático selecionado a partir de álcool de benzila de benzila, fenol e uma combinação de álcool de benzila de benzila e cloreto de benzalcônio.

[0083] Em uma modalidade mais preferida, a invenção provê um método para a fabricação de uma composição farmacêutica líquida, para uso em multidoses, compreendendo formar uma solução aquosa de LH ou variante de LH, um agente estabilizador selecionado do grupo da arginina, lisina, ou uma mistura ou um sal do mesmo, e um agente bacteriostático selecionado a partir de álcool de benzila, fenol, e uma combinação de álcool de benzila de benzila e cloreto de benzalcônio, e WFI (água para injeção).

[0084] Em ainda outra modalidade preferida, a invenção provê um método para a preparação de uma composição farmacêutica empaco-

tada compreendendo dispensar uma solução compreendendo LH ou variante de LH, um agente estabilizador selecionado do grupo da arginina, lisina, ou uma mistura ou um sal do mesmo, e um agente bacteriostático selecionado a partir de álcool de benzila de benzila, fenol, e uma combinação de álcool de benzila e cloreto de benzalcônio.

[0085] Em ainda outra modalidade preferida, a invenção provê um artigo para fabricação para uso farmacêutico humano, compreendendo um frasco que compreende uma solução de LH ou variante de LH, um agente estabilizador selecionado do grupo da arginina, lisina, ou uma mistura ou um sal do mesmo, e um agente bacteriostático selecionado a partir de álcool de benzila, fenol, e uma combinação de álcool de benzila e cloreto de benzalcônio, e um rótulo determinando que essa solução pode ser mantida durante um período de em ou cerca de vinte e quatro horas ou mais após o primeiro uso. Preferivelmente, o rótulo determina que a solução pode ser mantida até em ou cerca de 12 ou 14 dias após o primeiro uso.

[0086] Antes da primeira utilização, ou seja, antes do selo do frasco ampola ou cartucho ser quebrado, as formulações da invenção podem ser mantidas por, pelo menos, ou cerca de 6 meses, 12 meses ou 24 meses.

[0087] Sob condições de armazenamento preferenciais, antes da primeira utilização, as formulações são mantidas longe da luz (de preferência no escuro), em temperatura igual ou cerca de 2-8° C, de preferência mais ou menos cerca de 4-5° C.

[0088] Como mencionado acima, a invenção provê formulações líquidas de LH ou variante de LH para uso individual e uso em múltiplas doses, contendo um bacteriostático. As formulações da invenção são adequadas para uso farmacêutico ou veterinário.

[0089] Como mencionado acima, em uma modalidade preferida, a invenção provê um artigo de manufatura, que inclui material de emba-

lagem e um frasco compreendendo uma solução de LH ou variante de LH, um agente estabilizador selecionado do grupo da arginina, lisina, ou uma mistura ou um sal do mesmo, um agente bacteriostático selecionado a partir de álcool de benzila, fenol, e uma combinação de álcool de benzila e cloreto de benzalcônio, opcionalmente, com tampões e/ou excipientes, em um solvente aquoso, em que o dito material de embalagem inclui um rótulo que determina que essa solução pode aguardar durante um período de vinte e quatro horas ou mais após o primeiro uso.

[0090] Preferivelmente as formulações da invenção retêm, pelo menos, cerca de 80% da atividade de LH no momento de embalar durante um período de 24 meses (antes do primeiro uso). A atividade de LH pode ser medida usando o bioensaio de ganho de peso das vesículas seminais de um rato.

[0091] As formulações da presente invenção podem ser preparadas por um processo que compreende misturar LH ou uma variante da mesma, e uma quantidade estabilizadora de arginina ou sais da mesma e/ou lisina ou sais da mesma, e opcionalmente um agente bacteriostático selecionado a partir de álcool de benzila, fenol e uma combinação de álcool de benzila e cloreto de benzalcônio como um diluente aquoso. Misturando os componentes e dissolvendo-os em um diluente aquoso é realizado usando procedimentos de dissolução e mistura. Para preparar uma formulação apropriada, por exemplo, uma quantidade medida de LH ou variante de LH em solução tamponada é combinado com arginina ou sais da mesma e/ou lisina ou sais da mesma, e opcionalmente um bacteriostático selecionado a partir de álcool de benzila, fenol, e uma combinação de álcool de benzila e cloreto de benzalcônio em uma solução tamponada em quantidades suficientes para prover a proteína, arginina ou sais das mesmas e/ou lisina ou sais da mesma e o bacteriostático opcional a concentrações deseja-

das. A solução resultante é depois dispensada dentro de frascos, ampolas ou cartuchos. Variações deste processo serão reconhecidas por alguém de conhecimento comum da técnica.

[0092] Por exemplo, a ordem em que os componentes são adicionados, se aditivos são usados, a temperatura e o pH em que formulação é preparada, são todos fatores que podem ser otimizados para a concentração e meios de administração usados.

[0093] Em uma modalidade preferida, as formulações da invenção são feitas através da preparação de soluções de estoques individuais de concentração conhecida de todos os componentes da formulação (por exemplo, tampão de fosfato de sódio, arginina ou sais da mesma e/ou lisina ou os sais da mesma, Polissorbato 20, metionina, LH), verificando alíquotas e valores volumétricos para formar uma "solução-mãe" da mesma composição como formulação final. A "solução-mãe" é, preferivelmente filtrada através de uma membrana de PDF de 0,22 micron Duropore ® (Millipore), para remover os micro-organismos e depois as alíquotas são dispensadas em recipientes individuais, tais como frascos, ampolas ou cartuchos.

[0094] As formulações da invenção podem ser usadas em combinação com formulações compreendendo FSH ou variante de FSH (por exemplo, F-Gonal ®).

[0095] As formulações da presente invenção podem ser administradas por meio de dispositivos reconhecidos. Exemplos que compreendem estes sistemas de frasco único incluem dispositivos de caneta injetora para distribuição de uma solução tal como EasyJect ®, Gonal-F® Pen, Humaject ®, NovoPen ®, BD® Pen, AutoPen ® e OptiPen®.

[0096] Os produtos presentemente reivindicados incluem material de embalagem. O material de embalagem oferece, além das informações exigidas pelos órgãos reguladores, as condições sob as quais o produto pode ser utilizado. Para a solução do produto em frasco único,

o rótulo indica que essa solução pode ser armazenada após a primeira utilização por um período de vinte e quatro horas ou mais, de preferência até 12 ou 14 dias. Os produtos atualmente reivindicados são úteis para o uso de produtos farmacêuticos para ser humano.

[0097] Os exemplos a seguir são fornecidos meramente para ainda ilustrar a preparação das formulações e composições da invenção. O escopo da invenção não deve ser interpretado como meramente consistindo nos exemplos a seguir.

Exemplos

Materiais

<u>Item</u>	<u>Fabricante</u>
Massa de r-hLH	Laboratoires Serono SA
Monocloridrato de L-Arginina	Merck código 1.01544
Cloreto de benzalcônio	Fluka código 12063
Álcool de benzila	Merck código 1.00987
m-Cresol	Merck código 8.09691
L-Glicina	Merck código 5.00190
Monocloridrato de L-Lisina	Merck código 1.05701
Metionina	Merck código 1.05707
Fenol	Merck código 1.00200
Ácido Orto-fosfórico a 85% (Ph Eur, BP, NF)	Merck código 1.00563
Hidróxido de sódio	Merck código 1.06498
di-hidrato de di-hidrogenofosfato de sódio	Merck código 1.06580
Mono-hidrato de di- hidrogenofosfato de sódio	Merck código 1.06346
Sulfato de sódio anidro	Merck código 1.006649
Sorbitol	Sigma código S-1876
Sacarose	Merck código 1.07653

<u>Item</u>	<u>Fabricante</u>
Trealose	Merck código 1.08216
Polissorbato 20	Merck código 8.22184
Água	milliQ

[0098] O estudo a seguir avaliou os seguintes parâmetros para um grande número de formulações:

- Investigação sobre agentes estabilizantes e/ou bacterios-táticos

- Compatibilidade com formulações FSH
- Compatibilidade com a embalagem primária
- Perfil de estabilidade após o armazenamento

[0099] As formulações foram formulações de monodose e de multidoses líquidas. Os seis agentes estabilizadores a seguir foram avaliados:

- monoclóridrato de L-arginina (ARG ou arginina nos exemplos)

- monoclóridrato de L-lisina (LYS ou lisina nos exemplos)
- Trealose (TRE)
- L-glicina (GLI ou glicina nos exemplos)
- Sacarose (SAC)
- Sorbitol (SOR)

[00100] Os quatro agentes bacteriostáticos a seguir foram avaliados para as formulações de multidose:

- Álcool de benzila (BA)
- m-Cresol MCR ()
- Fenol (Phe)
- Combinação de álcool de benzila e cloreto de benzalcônio

(BACL)

Exemplo 1 - Investigação sobre agentes estabilizadores de formula-

ções de monodose

[00101] Seis agentes estabilizadores (sacarose, arginina, glicina, lisina, sorbitol e trealose) foram testados para proverem formulações de monodose estáveis. As formulações testadas estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das diversas formulações de monodose de r-hLH contendo diferentes agentes estabilizantes

Compo- nentes Qtd/ml	SAC/250	ARG/250	GLY/250	LYS/250	SOR/250	TRE/250
r-hLH a granel	6ug	6ug	6ug	6ug	6ug	6ug
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg
Metionina	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
Polissor- bato 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Sacarose	105 mg	-	-	-	-	-
Arginina	-	33 mg	-	-	-	-
Glicina	-	-	23 mg	-	-	-
Lisina	-	-	-	28 mg	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	56,5 mg	-
Trealose	-	-	-	-	-	106 mg
WFI	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml

q.s. = quantidade suficiente

[00102] Cerca de 40 ml de cada solução foram preparados, filtrados em membrana de 0,22 µm em um suporte de aço inoxidável de 22 ml, e armazenados a 2-8° C, +25° C e +40° C em 15 ml de tubos de plás-

tico. As soluções foram testadas para o conteúdo de proteína (por SE-HPLC), as formas oxidadas (por RP-HPLC), os agregados (por SE-HPLC) e formação de subunidades (qualitativamente, por SE-HPLC) até 1 mês. Os resultados do painel de testes completo aplicado a esse conjunto de formulações são relatados nas tabelas 2 e 5.

Tabela 2. Pureza por SE-HPLC (temperatura de armazenamento: +40°C)

Formulação	% de heterodímeros			% de Subunidades livres	% de agregados				
	T=0	T=1d	T=4d		T=0	T=1d	T=4d		
SAC/250	96,37	62,27	50,61	0,00	33,71	45,04	3,63	4,02	4,36
GLY/250	95,29	56,55	42,55	0,00	36,42	54,04	4,71	6,43	3,42
ARG/250	95,82	52,91	23,80	0,00	39,83	71,53	4,18	7,27	4,68
LYS/250	95,66	63,26	36,55	0,00	32,57	59,85	4,35	4,18	3,60
SOR/250	95,55	65,87	41,57	0,00	29,64	53,95	4,45	4,49	4,49
TRE/250	92,73	58,22	42,41	0,00	32,62	48,63	7,28	9,16	8,97

T = tempo; d = dia(s)

Tabela 3. Pureza por SE-HPLC (temperatura de armazenamento: +25°C)

Formulação	% de heterodímeros			% de Subunidades livres	% de agregados				
	T=0	T=7d	T=1M		T=0	T=7d	T=1M		
SAC/250	96,37	86,52	81,99	0,00	—	12,34	3,63	13,48	5,68
GLY/250	95,29	97,41	78,52	0,00	—	18,64	4,71	2,59	2,84
ARG/250	95,82	98,01	80,80	0,00	—	16,15	4,18	2,00	3,06
LYS/250	95,66	99,20	80,83	0,00	—	17,19	4,35	0,81	1,99
SOR/250	95,55	80,63	26,45	0,00	18,72	72,27	4,45	0,66	1,28
TRE/250	92,73	95,29	74,86	0,00	—	17,24	7,28	4,71	7,91

M = mês

Tabela 4. % de formas oxidadas por RP-HPLC

Formulação	12 dias (+40°C)	1 Mês (+25°C)
SAC/250	7,62	21,84
GLY/250	7,46	n.d.
ARG/250	6,26	9,59
LYS/250	6,68	4,90
SOR/250	6,62	24,58
TRE/250	19,95	10,45

n.d. = não disponível

Tabela 5. Conteúdo de r-hLH por SE-HPLC

Formulação	T=0	T=1d (+40°C)	T=4d (+40°C)	T=0	T=1M (+25°C)
SAC/250	5,50	4,20	4,50	5,50	5,40
GLY/250	6,10	5,10	5,10	6,10	5,03
ARG/250	6,30	6,70	6,40	6,30	6,33
LYS/250	6,00	4,80	5,50	6,00	6,02
SOR/250	5,30	4,80	5,10	5,30	4,93
TRE/250	5,40	4,80	5,40	5,40	5,23

[00103] Com base nestes resultados, sacarose, lisina e arginina foram selecionadas como os melhores excipientes para serem ainda investigados para a sua compatibilidade com uma quantidade cada vez maior (250 µg/ml e 500 µg/ml) de metionina como antioxidante. A composição das soluções testadas está reportada na Tabela 6. Deverá ser observado que estas soluções foram preparadas *ex novo*.

Tabela 6. Composição das formulações de monodose de r-hLH contendo os agentes estabilizadores selecionados e diferentes quantidades de metionina

Componentes Qtd/ml	SAC/250	ARG/250	LYS/250	SAC/500	ARG/500	LYS/500
r-hLH a granel	6µg	6µg	6µg	6µg	6µg	6µg
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg
Metionina	250 µg	250 µg	250 µg	500 µg	500 µg	500 µg
Polissor- bato 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Saccharose	105 mg	-	-	105 mg	-	-
Arginina	-	33 mg	-	-	33 mg	-
Lisina	-	-	28 mg	-	-	28 mg
WFI	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml

[00104] Cerca de 100 ml de cada solução foram preparados, filtrados em membrana de 0,22 µm em um suporte de aço inoxidável de 22 ml, e preenchidos em 1 ml de seringas de vidro para testar também a compatibilidade entre o fármaco e o recipiente final (1 ml seringa de vidro + êmbolo). As seringas foram armazenadas a 2-8° C, 25° C, 33° C e 40° C. A temperatura de armazenamento de +33° C foi introduzida a fim de ter uma conciliação entre uma degradação cinética muito rápida (+40° C) e uma muito baixa (25° C). As soluções foram testadas para o índice de r-hLH (por SE-HPLC), as formas oxidadas (por RP-HPLC), os agregados (por SE-HPLC) e formação de subunidades (qualitativamente, por SE-HPLC) até 2-3 meses. Os resultados do pai-

nel completo de testes aplicados às formulações descritas na Tabela 6 são apresentados nas Tabelas 7 a 11.

Tabela 7. Pureza por SE-HPLC (temperatura de armazenamento: +40°C)

Formulação	% de heterodímeros		% de subunidades livres		% de agregados		% de heterodímeros (2-8°C)	
	T=0	T=4d	T=0	T=4d	T=0	T=4d	T=0	T=13s
SAC/250	99,12	38,98	—	60,29	0,89	0,74	99,12	97,96
ARG/250	98,30	9,16	—	90,03	1,70	0,83	98,30	99,23
LYS/250	98,59	18,27	—	81,02	1,41	0,72	98,59	99,69
SAC/500	99,34	33,96	—	64,11	0,66	1,93	99,34	98,66
ARG/500	98,41	13,49	—	85,94	1,59	0,57	98,41	99,36
LYS/500	98,72	29,07	—	69,89	1,22	1,05	98,72	99,68

s = semanas

Tabela 8. Pureza por SE-HPLC (temperatura de armazenamento: +33°C)

Formulação	% de heterodímeros					% de subunidades livres				
	T=0	T=6d	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=6d	T=4s	T=6s	T=8s
SAC/250	99,12	69,75	65,46	64,82	n.d.	—	29,25	46,04	32,49	n.d.
ARG/250	98,30	65,03	39,69	37,00	31,37	—	32,20	58,05	61,22	63,90
LYS/250	98,52	74,96	53,95	46,28	43,23	—	23,59	44,42	52,58	55,09
SAC/500	99,34	71,26	43,14	27,77	n.d.	—	27,12	50,74	52,34	n.d.
ARG/500	98,41	67,04	38,04	32,62	25,34	—	31,14	58,48	65,37	70,81
LYS/500	98,72	74,03	52,81	49,17	43,88	—	24,88	45,07	49,04	53,24

Formulação	% de agregados				
	T=0	T=6d	T=4s	T=6s	T=8s
SAC/250	0,89	1,01	n.d.	2,70	n.d.
ARG/250	1,70	2,77	2,26	1,79	4,74
LYS/250	1,41	1,45	1,64	1,14	1,69
SAC/500	0,66	1,63	19,90	6,12	n.d.
ARG/500	1,59	1,83	3,48	2,02	3,86
LYS/500	1,22	1,09	2,12	1,79	2,85

Tabela 9. Pureza por SE-HPLC (temperatura de armazenamento: +25°C)

Formulação	% de heterodímeros			% de Subunidades livres	% de agregados				
	T=0	T=4s	T=8s		T=0	T=4s	T=8s	T=0	T=4s
SAC/250	99,12	98,36	76,81	—	—	21,05	0,89	1,65	2,15
ARG/250	98,30	79,80	73,39	—	17,89	23,99	1,70	2,32	2,63
LYS/250	98,59	84,15	77,60	—	13,78	21,23	1,41	n.d.	1,18
SAC/500	99,34	n.d.	61,24	—	n.d.	33,50	0,66	n.d.	5,26
ARG/500	98,41	n.d.	69,45	—	n.d.	27,93	1,59	n.d.	2,63
LYS/500	98,72	n.d.	78,56	—	n.d.	19,81	1,22	n.d.	1,64

Tabela 10. % de formas oxidadas por RP-HPLC

Formulação	4 dias (+40°C)	8 semanas (+25°C)	4 semanas (+33°C)	6 semanas (+33°C)
SAC/250	6,13	7,32	9,72	20,13
SAC/500	17,37	35,78	39,12	45,93
ARG/250	6,29	5,96	9,72	7,02
ARG/500	4,69	5,67	6,69	8,10
LYS/250	5,24	5,05	8,00	8,63
LYS/500	3,25	4,02	5,71	6,84

Tabela 11. Conteúdo de r-hLH por SE-HPLC

Formulação	T=0	T=4dias (+40°C)	T=8sem. (+25°C)	T=4sem. (+33°C)	T=6sem. (+33°C)	T=8sem. (+33°C)
SAC/250	5,03	3,09	5,09	5,31	4,74	n.d.
SAC/500	6,27	4,92	6,00	5,96	5,63	6,20
ARG/250	5,90	3,74	5,50	5,63	5,34	5,17
ARG/500	5,00	3,36	4,25	5,05	n.d.	n.d.
LYS/250	6,14	4,54	5,74	5,83	5,58	5,84
LYS/500	6,08	3,91	5,61	5,73	5,49	5,48

[00105] Com base nestes resultados a sacarose apresentou maior compatibilidade com 250 µg/ml de metionina, lisina com 500 mg/ml de metionina e arginina, com ambas as concentrações de metionina.

Exemplo 2 - Compatibilidade de formulações líquidas monodose de r-hLH com formulação líquida de FSH multidoses

[00106] Em vista dos resultados descritos no Exemplo 1, as formulações descritas na Tabela 6 foram misturadas com uma formulação de FSH (isto é, formulação líquida de multidoses Gonal-F[®]) e testadas após 24 h de contato a 25°C de acordo com os métodos abaixo:

- RP-HPLC para r-hFSH e formas oxidadas de subunidade α de r-hLH (na Tabela 12 sob % de pureza as formas não-oxidadas são reportadas)

- SE-HPLC para quantificação de agregados

- RP-HPLC para r-hFSH e titulação de r-hLH,

- bioensaio *in vivo* de r-hFSH e r-hLH

- SDS-PAGE para r-hFSH e subunidades livres e quantificação de agregados de r-hLH (dados não reportados)

- aparência visual.

[00107] Os resultados estão apresentados nas tabelas 12 a 14.

Tabela 12. Pureza por RP-HPLC e % de agregados por SE-HPLC

Formulação	% de pureza		% de agregados	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/250	98,53	98,61	0,00	0,00
ARG/250	97,29	99,17	0,00	0,72
LYS/250	97,81	97,73	0,00	0,37
SAC/500	98,50	98,17	0,00	0,39
ARG/500	97,75	97,47	0,00	0,69
LYS/500	97,04	96,74	0,00	0,33

h = horas

Tabela 13. Conteúdo de FSH e LH

Formulação	Conteúdo* de r-hFSH		Conteúdo* de r-hLH	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/250	16,14	16,14	3,67	3,61
ARG/250	15,45	16,01	4,15	4,21
LYS/250	15,35	15,68	4,07	4,15
SAC/500	16,29	16,91	3,71	3,70
ARG/500	16,03	15,80	4,15	4,05
LYS/500	15,46	15,69	4,05	4,17

FSH teórico: 200 IU=15,48 µg/ml; ' LH teórico: 100 IU=4 µg/ml

Tabela 14. Bioensaio

Formulação	Atividade de r-hFSH		Atividade de r-hLH	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/250	174,60	183,70	108,00	109,00

[00108] Todas as formulações de monodose testadas foram compatíveis com formulação de multidose de Gonal-F ® como havia:

- Sem perda de conteúdo de FSH e LH,
- Sem oxidação,
- Sem agregação e dissociação de subunidades livres (por

SDS-PAGE)

- Sem perda de bioatividade em LH e FSH .

Exemplo 3 - Estudo de Estabilidade de formulações líquidas de monodose

[00109] Com base nos resultados dos exemplos anteriores, as formulações descritas na Tabela 6, exceto aquelas que contêm arginina, foram preparadas em duas concentrações diferentes de r-hLH (6 µg/ml e 12 µg/ml), armazenadas a 2-8° C e +25° C e testadas de acordo com um rigoroso plano de estabilidade e de acordo com os métodos analíticos a seguir:

- RP-HPLC para conteúdo de LH
- RP-HPLC para formas oxidadas de subunidade α
- SDS-PAGE para subunidades livres e agregadas
- Bioensaio
- pH da solução
- Aparência visual

[00110] Uma análise estatística foi realizada sobre os resultados de todos os parâmetros que foram identificados como indicativos da estabilidade com o auxílio do software Stabileo 1,1.

Concentração de r-hLH (por RP-HPLC) em armazenamento a 2-8° C e 25 ± 2° C

[00111] Nenhuma perda estatisticamente significativa na concentração de proteína foi observada para as formulações após o armazenamento por 6 meses a 2-8 ° C, independentemente da concentração de r-hLH (6 µg/ml e 12 µg/ml). Uma diminuição comum de 0,4 µg/mês foi observada após 6 meses de armazenamento a 25 ± 2 ° C.

bioatividade de r-hLH (bioensaio) sob armazenamento a 2-8° C e 25 ± 2° C

[00112] Nenhuma perda relevante da bioatividade foi observada para as formulações depois de 6 meses de armazenamento a 2-8° C e

a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ qualquer que fosse a concentração de r-hLH (6 $\mu\text{g/ml}$ e 12 $\mu\text{g/ml}$).

% de subunidades e agregados por SDS-PAGE

[00113] A percentagem de agregados por SDS-PAGE permanece abaixo de 2% para ambas as concentrações após 6 meses de armazenamento a $2-8^\circ\text{C}$ e 25°C . O percentual de subunidades por SDS-PAGE permanece abaixo de 2% para ambas as concentrações após armazenamento por 6 meses a $2-8^\circ\text{C}$. Uma diminuição comum de cerca de 5% / mês foi observada depois de 6 meses de armazenamento a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

% de formas oxidadas por RP-HPLC

[00114] Um aumento de cerca de 0,4% / mês foi medido após armazenamento por 6 meses a $2-8^\circ\text{C}$ e um aumento no intervalo de 0,6-1,4% / mês a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

pH e aparência

[00115] Nenhuma mudança na aparência (cor, nitidez, partículas visíveis), nem no pH foi observada durante a preparação e mediante o armazenamento.

Exemplo 4 - Compatibilidade de estabilização e agentes bacteriostáticos para formulações multidoses

[00116] Seis agentes de estabilização (sacarose, arginina, glicina, lisina, sorbitol e trealose) foram testados para a compatibilidade com os agentes bacteriostáticos para prover formulações de multidoses estáveis. As formulações testadas estão resumidas na Tabela 15.

Tabela 15. Composição das diversas formulações de multidoses de r-hLH contendo diferentes combinações de agentes estabilizadores e bacteriostáticos

Componentes Qtd/ml	SAC/250 BA	SAC/250 mCr	SAC/250 Phe	ARG/250 BA	ARG/250 mCr	ARG/250 Phe
r-hLH a granel	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Na ₂ HP0 ₄ 2H ₂ O	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg
Metionina	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
Polissorbato 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Sacarose	105 mg	105 mg	105 mg	-	-	-
Arginina	-	-	-	33 mg	33 mg	33 mg
Álcool Benzí- lico	0,90%	-	-	0,90%	-	-
m-Cresol	-	0,30%	-	-	0,30%	-
Fenol	-	-	0,50%	-	-	0,50%
WFI	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml

Componentes Qtd./ml	LYS/250 BA	LYS/250m Cr	LYS/250 Phe	SOR/250 BA	SOR/250 mCr	SOR/250 Phe
r-hLH a granel	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Na ₂ HP0 ₄ 2H ₂ O	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg
Metionina	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
Polissorbato 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Lisina	28 mg	28 mg	28 mg	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	56,5 mg	56,5 mg	56,5 mg
Álcool benzíli- co	0,90%	-	-	0,90%	-	-
m-Cresol	-	0,30%	-	-	0,30%	-
Fenol	-	-	0.50%	-	-	0.50%

Componentes Qtd./ml	LYS/250 BA	LYS/250m Cr	LYS/250 Phe	SOR/250 BA	SOR/250 mCr	SOR/250 Phe
WFI	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml

Componentes Qtd./ml	GLY/250/ BA	GLY/250/ mCr	GLY/250/ Phe	TRE/250/ BA	TRE/250/ mCr	TRE/250/ Phe
Massa de r- hLH	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Na ₂ HP0 ₄ 2H ₂ O	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg
Metionina	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
Polissorbato 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Glicina	23 mg	23 mg	23 mg	-	-	-
Trealose	-	-	-	106 mg	106 mg	106 mg
Álcool benzíli- co	0,90%	-	-	0,90%	-	-
m-Cresol	-	0,30%	-	-	0,30%	-
Fenol	-	-	0.50%	-	-	0,50%
WFI	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml

[00117] Cerca de 40 ml de cada solução foram preparados, filtrados em 0,22 µm de membrana e armazenados a 2-8° C, 25° C e 40° C em tubos de plástico de 15 ml. As soluções foram testadas para o conteúdo de proteína (por exclusão de tamanho-HPLC, SE-HPLC, dados não mostrados), as formas oxidadas (por fase reversa HPLC, RH-HPLC), agregados (por SE-HPLC) e formação de subunidades (qualitativa-mente, por SE-HPLC) até 1 mês. Os resultados do painel completo de testes aplicados a esse conjunto de formulações estão reportados nas Tabelas 16 a 18. Todas as soluções contendo m-Cresol (MCR) se tornaram opalescentes mesmo imediatamente após a fabricação, devido a uma incompatibilidade entre o agente bacteriostático e o tensoativo

(Polissorbato 20).

Tabela 16. Pureza por SE-HPLC (temperatura de armazenamento: +40°C)

Formulação	% de heterodímeros			%	de Subunidades livres			% de agregados		
	T=0	T=1d	T=4d		T=0	T=1d	T=4d	T=0	T=1d	T=4d
SAC/250/mCr	98,91	89,61	52,93	—	n.d.	23,67	1,10	10,38	23,41	
SAC/250/BA	95,50	74,04	51,52	—	22,65	45,12	4,50	3,33	3,36	
SAC/250/Phe	98,34	74,20	67,13	—	19,63	23,71	1,66	5,57	9,17	
GLY/250/mCr	97,95	96,54	86,76	—	9,55	n.d.	2,05	3,14	n.d.	
GLY/250/BA	96,08	59,58	41,59	—	37,82	56,45	3,92	2,61	1,97	
GLY/250/Phe	96,49	74,71	86,06	—	20,01	9,22	2,51	5,28	4,73	
ARG/250/mCr	97,94	70,34	44,39	—	28,39	53,33	2,06	1,29	2,29	
ARG/250/BA	91,44	35,99	15,91	—	58,99	79,65	8,57	5,03	4,45	
ARG/250/Phe	95,31	63,27	29,12	—	33,75	67,18	4,69	2,98	3,70	

Formulação	% de heterodímeros			%	de Subunidades livres			% de agregados		
	T=0	T=1d	T=4d		T=0	T=1d	T=4d	T=0	T=1d	T=4d
LYS/250/mCr	98,19	81,57	65,68	—	17,99	33,10	1,81	n.d.	1,22	
LYS/250/BA	94,75	47,94	33,61	—	48,59	63,14	5,26	3,48	3,26	
LYS/250/Phe	97,91	72,68	56,73	—	26,18	42,26	2,09	1,16	1,01	
SOR/250/mCr	90,46	86,33	58,78	—	n.d.	18,87	9,55	13,68	22,36	
SOR/250/BA	94,08	62,71	45,27	—	64,17	47,22	5,93	3,13	7,52	
SOR/250/Phe	94,74	70,58	55,75	—	22,30	32,76	5,26	7,13	11,50	
TRE/250/mCr	86,07	77,26	40,60	—	n.d.	20,87	13,93	22,74	38,53	
TRE/250/BA	94,74	69,53	42,19	—	21,36	44,22	5,26	9,12	12,88	
TRE/250/Phe	91,05	85,29	54,89	—	n.d.	24,28	8,95	14,72	20,83	

Tabela 17. Pureza por SE-HPLC (temperatura de armazenamento: +25°C)

Formulação	% de heterodímeros			% de subunidades livres			% de agregados		
	T=0	T=7d	T=1M	T=0	T=7d	T=1M	T=0	T=7d	T=1M
SAC/250/mCr	98,91	53,76	69,30	—	31,19	15,13	1,10	14,34	15,57
SAC/250/BA	95,50	95,04	75,84	—	—	14,66	4,50	4,96	9,50
SAC/250/Phe	98,34	93,82	85,49	—	—	—	1,66	6,18	14,51
GLY/250/mCr	97,95	97,00	95,39	—	—	—	2,05	3,00	4,62
GLY/250/BA	96,08	97,63	68,21	—	—	28,42	3,92	2,37	2,17
GLY/250/Phe	96,49	97,44	93,19	—	—	—	2,51	2,57	6,10
ARG/250/mCr	97,94	98,73	78,33	—	—	19,73	2,06	1,28	1,94
ARG/250/BA	91,44	97,38	79,79	—	—	18,91	8,57	2,63	1,31
ARG/250/Phe	95,31	98,33	82,18	—	—	16,59	4,69	1,67	1,23
LYS/250/mCr	98,19	98,28	95,38	—	—	—	1,81	1,73	4,27
LYS/250/BA	94,75	97,39	82,54	—	—	14,66	5,26	2,61	2,80
LYS/250/Phe	97,91	99,55	98,61	—	—	—	2,09	0,46	1,40
SOR/250/mCr	90,46	82,65	64,24	—	—	—	9,55	17,23	35,76
SOR/250/BA	94,08	95,93	68,59	—	—	21,99	5,93	4,08	9,43
SOR/250/Phe	94,74	92,55	81,96	—	—	—	5,26	7,46	18,05
TRE/250/mCr	86,07	75,78	45,61	—	—	—	13,93	24,23	54,40
TRE/250/BA	94,74	91,22	67,28	—	—	13,75	5,26	8,79	18,97
TRE/250/Phe	91,05	84,53	66,79	—	—	—	8,95	15,47	33,22

Tabela 18. % de formas oxidadas por RP-HPLC

Formulação	12 dias (+40°C)	1 Mês (+25°C)
SAC/250/mCr	51,14	16,62
SAC/250/BA	14,07	8,83
SAC/250/Phe	25,55	17,54
GLY/250/mCr	59,29	5,43

Formulação	12 dias (+40°C)	1 Mês (+25°C)
GLY/250/BA	10,53	4,44
GLY/250/Phe	34,86	16,06
ARG/250/mCr	65,27	3,13
ARG/250/BA	7,12	5,65
ARG/250/Phe	15,49	11,27
LYS/250/mCr	44,05	16,36
LYS/250/BA	13,69	9,30
LYS/250/Phe	56,55	17,86
SOR/250/mCr	58,29	25,68
SOR/250/BA	13,51	8,49
SOR/250/Phe	30,78	17,75
TRE/250/mCr	45,84	26,36
TRE/250/BA	19,12	11,41
TRE/250/Phe	23,87	27,76

[00118] Com base nesses resultados, sacarose, lisina e arginina foram escolhidas como os melhores agentes de estabilização a ser investigados por sua compatibilidade com uma maior quantidade de metionina (500 µg/ml). Álcool de benzila, fenol e uma combinação de álcool de benzila e cloreto de benzalcônio foram selecionados como agentes bacteriostáticos. As formulações testadas estão resumidas na Tabela 19.

Tabela 19. Composição das diversas formulações de multidoses de r-hLH contendo os agentes estabilizadores e diferentes agentes bacteriostáticos selecionados

Compo- nentes	SAC/500	SAC/500	SAC/500	ARG/500	ARG/500	ARG/500
	BA	BACL	Phe	BA	BACL	Phe
r-hLH a granel	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg

Componentes	SAC/500	SAC/500	SAC/500	ARG/500	ARG/500	ARG/500
Qtd./ml	BA	BACL	Phe	BA	BACL	Phe
Na ₂ HP0 ₄ 2H ₂ O	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg
NaH ₂ P0 ₄ H ₂ O	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg
Metionina	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg
Polissor-bato 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Sacarose	105 mg	105 mg	105 mg	-	-	-
Arginina	-	-	-	33 mg	33 mg	33 mg
Álcool benzílico	1,2%	0,30%	-	1,2%	0,30%	-
Cloreto de Benzalcônio	-	0,001%	-	-	0,001%	-
Fenol	-	-	0,50%	-	-	0,50%
WFI	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1ml	q.s. p/ 1ml	q.s. p/ 1ml

Componentes	LYS/500/BA	LYS/500/BACL	LYS/500/Phe
Quantidade/ml			
r-hLH a granel	25 µg	25 µg	25 µg
Na ₂ HP0 ₄ 2H ₂ O	1,65 mg	1,65 mg	1,65 mg
NaH ₂ P0 ₄ H ₂ O	0,104 mg	0,104 mg	0,104 mg
Metionina	500 µg	500 µg	500 µg
Polissorbato 20	50 µg	50 µg	50 µg
Lisina	28 mg	28 mg	28 mg
Álcool benzílico	1,2%	0,30%	-

Componentes Quantidade/ml	LYS/500/BA	LYS/500/BACL	LYS/500/Phe
Cloreto de Benzalcônio	-	0,001%	-
Fenol	-	-	0,50%
WFI	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml	q.s. p/ 1 ml

[00119] Cerca de 100 ml de cada solução foram preparados, filtrados em membrana de 0,22 µm e preenchidos em cartuchos de 3 ml. As embalagens primárias a seguir foram utilizadas:

- cartuchos de vidro de 3 ml (Nuova Ompi) siliconizados
- Cápsulas de esmagar código CAP J 3ML L1H075-1-H1B FM 257 / 2 (Helvoet Pharma)
- êmbolos revestidos: Helvoet V9282 FM257 / 2 Omniflex revestidos.

[00120] Os cartuchos foram armazenados a 2-8 °C, 25 °C e 40 °C para ser testados em relação ao conteúdo de proteína (por SE-HPLC), as formas oxidadas (por RH-HPLC), os agregados (por SE-HPLC) e a formação de subunidades (qualitativamente, por SE-HPLC) por até 2 meses.

[00121] Os resultados do painel de testes completo aplicado para este segundo conjunto de formulações estão reportados nas Tabelas 20-26.

Tabela 20. Pureza por SE-HPLC (temperatura de armazenamento: 40 °C)

Formulação	% de heterodímeros		% de subunidades livres		% de agregados	
	T=0	T=3 dias	T=0	T=3 dias	T=0	T=3 dias
SAC/500/BA	100,00	60,01	—	39,55	—	0,44
SAC/500/BACL	100,00	67,39	—	32,34	—	0,27
SAC/500/Phe	99,66	65,01	—	31,27	0,34	3,72

Formulação	% de heterodímeros		% de subunidades livres		% de agregados	
	T=0	T=3 dias	T=0	T=3 dias	T=0	T=3 dias
ARG/500/BA	99,91	45,63	—	54,65	0,10	—
ARG/500/BACL	99,93	44,67	—	55,33	0,07	—
ARG/500/Phe	99,93	61,97	—	38,03	0,08	—
LYS/500/BA	99,93	61,71	—	38,30	0,08	—
LYS/500/BACL	99,95	61,33	—	38,68	0,06	—
LYS/500/Phe	99,93	76,03	—	23,59	0,08	0,39

Tabela 21. Pureza por SE-HPLC (temperatura de armazenamento: +33°C)

Formulação	% de heterodímeros				% de subunidades livres			% de agregados	
	T=0	T=3s	T=4s	T=8s	T=0	T=3s	T=4s	T=0	T=3s
SAC/500/BA	100,00	76,56	71,22	59,22	—	22,03	26,35	/	1,43
SAC/500/BACL	100,00	81,49	78,95	63,53	—	17,26	20,10	/	1,26
SAC/500/Phe	99,66	76,24	67,13	51,10	—	14,26	18,03	0,34	9,51
ARG/500/BA	99,91	71,90	71,52	61,41	—	27,89	27,73	0,10	0,21
ARG/500/BACL	99,93	69,08	66,86	57,22	—	30,67	32,94	0,07	0,26
ARG/500/Phe	99,93	86,11	76,74	75,51	—	13,76	22,55	0,08	0,14
LYS/500/BA	99,93	83,09	76,72	67,30	—	16,76	22,50	0,08	0,16
LYS/500/BACL	99,95	81,03	75,21	70,20	—	18,88	24,64	0,06	0,09
LYS/500/Phe	99,93	87,29	80,51	68,85	—	12,10	18,53	0,08	0,62

Tabela 22. Pureza por SE-HPLC (temperatura de armazenamento: +25°C)

Formulação	% de heterodimeros			% de subunidades livres		% de agregados
	T=0	T=4s	T=8s	T=0	T=4s	T=0
SAC/500/BA	100,00	83,85	82,87	—	14,69	—
SAC/500/BACL	100,00	86,30	85,78	—	13,06	—
SAC/500/Phe	99,66	79,35	75,26	—	13,39	0,34
ARG/500/BA	99,91	82,32	82,13	—	17,39	0,10
ARG/500/BACL	99,93	80,42	80,77	—	19,25	0,07
ARG/500/Phe	99,93	84,59	80,95	—	15,13	0,08
LYS/500/BA	99,93	85,04	85,10	—	13,78	0,08
LYS/500/BACL	99,95	84,24	86,22	—	15,42	0,06
LYS/500/Phe	99,93	85,41	81,22	—	13,68	0,08

Tabela 23. % de formas oxidadas por RP-HPLC (temperatura de armazenamento: +33°C)

Formulação	T=0	T=3 semanas	T=8 semanas	T=13 semanas
SAC/500/BA	1,12	5,21	4,21	4,26
SAC/500/BACL	0,90	5,59	4,90	4,46
SAC/500/Phe	0,99	8,28	6,01	16,14
ARG/500/BA	0,69	4,52	4,13	2,65
ARG/500/BACL	1,13	4,57	3,57	2,97
ARG/500/Phe	0,94	4,60	5,24	4,82
LYS/500/BA	1,53	5,71	16,34	8,77
LYS/500/BACL	1,60	4,49	5,83	5,70
LYS/500/Phe	0,66	9,66	34,97	25,51

Tabela 24. % de formas oxidadas por RP-HPLC (temperatura de armazenamento: +25°C)

Formulação	T=0	T=4 semanas	T=8 semanas	T=13 semanas
SAC/500/BA	1,12	2,04	2,19	2,44
SAC/500/BACL	0,90	2,10	2,31	2,23
SAC/500/Phe	0,99	2,68	5,72	7,50
ARG/500/BA	0,69	1,40	1,61	1,65
ARG/500/BACL	1,13	1,46	2,31	1,89
ARG/500/Phe	0,94	1,31	2,77	2,35
LYS/500/BA	1,53	2,51	3,35	4,73
LYS/500/BACL	1,60	1,96	3,14	3,47
LYS/500/Phe	0,66	4,05	11,38	22,52

Tabela 25. % de formas oxidadas por RP-HPLC

Formulação	T=0	T=13 semanas (+5°C)	T=0	T=3 dias (+40°C)
SAC/500/BA	1,12	1,11	1,12	1,16
SAC/500/BACL	0,90	1,29	0,90	1,25
SAC/500/Phe	0,99	2,51	0,99	1,47
ARG/500/BA	0,69	1,03	0,69	0,64
ARG/500/BACL	1,13	1,16	1,13	1,06
ARG/500/Phe	0,94	2,02	0,94	1,47
LYS/500/BA	1,53	2,03	1,53	1,84
LYS/500/BACL	1,60	1,56	1,60	1,58
LYS/500/Phe	0,66	n.a.	0,66	3,10

Tabela 26. Conteúdo de r-hLH por SE-HPLC

Formulação	T=0	T=3d (+40°C)	T=3s (+33°C)	T=4s (+33°C)	T=8s (+33°C)	T=4s (+25°C)	T=8s (+25°C)
SAC/500/BA	20,38	21,70	21,05	22,54	16,47	23,70	18,43
SAC/500/BACL	21,73	22,06	21,31	22,64	18,77	23,65	18,10
SAC/500/Phe	21,24	21,49	21,02	22,53	20,71	22,66	17,23
ARG/500/BA	22,23	18,86	19,52	24,64	16,14	25,26	17,69
ARG/500/BACL	22,38	21,48	21,71	23,52	16,86	24,18	19,34
ARG/500/Phe	21,34	22,38	20,60	23,09	16,99	24,41	16,32
LYS/500/BA	20,33	20,93	18,85	22,10	14,93	24,24	17,36
LYS/500/BACL	23,83	21,78	20,68	23,44	15,50	24,07	18,60
LYS/500/Phe	21,34	21,05	20,20	21,89	16,50	22,99	16,56

[00122] Estes resultados confirmaram a compatibilidade dos agentes de estabilização com uma quantidade aumentada de metionina (ver Exemplo 1). Além disso, os resultados mostraram que os agentes bacteriostáticos são compatíveis com 500 µg/ml de metionina.

Exemplo 5 - Compatibilidade de formulações líquidas multidose de r-hLH com formulação líquida multidose de FSH

[00123] Com base nos resultados do Exemplo 4, as formulações de r-hLH em cartuchos de 3 ml, foram misturadas com uma formulação de FSH (isto é, formulação líquida de multidoses Gonal-F®) e testadas após 24 horas de contato a 25°C de acordo com os métodos a seguir:

- SE-HPLC para a pureza
- RP-HPLC para r-hFSH e titulação de r-hLH,
- RP-HPLC para r-hFSH e formas oxidadas de subunidade α de r-hLH ,
- bioensaio *in vivo* de r-hFSH e r-hLH
- SDS-PAGE para r-hFSH e subunidades livres de r-hLH e quantificação de agregados (dados não reportados)

- pH da solução,
- aparência visual.

[00124] Os resultados estão reportados nas tabelas 27 a 29.

Tabela 27. Pureza por SE-HPLC

Formulação	% de heterodímeros		% de agregados	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/500/BA	98,28	98,41	0,30	1,09
SAC/500/BACL	98,85	99,66	0,00	0,43
SAC/500/Phe	98,18	97,68	0,27	0,54
ARG/500/BA	98,31	98,61	0,28	0,98
ARG/500/BACL	97,68	98,52	0,33	0,53
ARG/500/Phe	97,89	97,73	0,44	0,77
LYS/500/BA	97,35	97,51	0,38	1,09
LYS/500/BACL	97,97	98,82	0,28	0,81
LYS/500/Phe	98,29	98,40	0,37	1,01

Tabela 28. Conteúdo de FSH e LH

Formulação	Conteúdo* de r-hFSH		conteúdo* de r-hLH	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/500/BACL	29,50	31,15	7,20	8,31
SAC/500/Phe	30,88	31,28	7,34	7,54
ARG/500/BA	30,46	31,00	8,02	8,44
ARG/500/BACL	32,23	32,84	7,12	7,40
ARG/500/Phe	30,07	31,06	7,78	8,05
LYS/500/BA	30,91	32,11	6,88	7,25
LYS/500/BACL	28,57	31,66	6,64	7,62
LYS/500/Phe	28,75	31,25	6,80	7,47

FSH teórico: 200 IU=30,96 µg/ml; ' LH teórico: 100 IU=8 µg/ml

Tabela 29. Bioensaio

Formulação	Atividade de r-hFSH		Atividade de r-hLH	
	T=0	T=24 h	T=0	T=24 h
SAC/500/BACL	365,7	355,0	227,0	212,7
ARG/500/Phe	387,5	393,0	231,4	243,0

[00125] Todas as formulações de multidoses testadas são compatíveis com formulação de multidoses de Gonal-F ® como ocorreram:

- Sem perda de conteúdo de FSH e LH,
- Sem oxidação,
- Sem agregação (por SE-HPLC)
- Sem agregados e formação de subunidades por SDS

PAGE-

- Sem perda de bioatividade de LH e FSH.

Exemplo 6 - Compatibilidade com a embalagem primária

[00126] A fim de testar a compatibilidade entre as formulações de r-hLH e os recipientes finais (seringas e cartuchos), um estudo da matriz foi levado a efeito para testar os parâmetros a seguir:

- Efeito da concentração de r-hLH: 6 mg / ml, 12 mg / ml, 24 mg / ml,
- Efeito do volume de enchimento: 0,25 ml, 0,5 ml, 1 ml,
- Tipo de recipiente: seringa de vidro de 1 ml e cartucho de vidro de 3ml,
- Efeito de agente bacteriostático: formulações preparadas com e sem os agentes bacteriostáticos e armazenadas em cartuchos de 3 ml.

[00127] Uma formulação (SAC/500/BACL) foi preparada em resistências diferentes de r-hLH e preenchida nos recipientes com diferentes volumes de enchimento. As bateladas foram comparadas qualitativamente por SE-HPLC até 1 semana a 33° C. Os resultados são reportados na figura 1 (A-F). Na figura 2 (A-B) são comparados o per-

centual de heterodímeros por SE-HPLC nas formulações com e sem a combinação de agentes bacteriostáticos. Analisando os resultados nas figuras 1 e 2, podem ser tiradas as conclusões a seguir:

- sem impacto do recipiente nas formulações de 12 µg/ml e 24 µg/ml
- sem impacto do volume de enchimento sobre as formulações de 12 µg/ml e 24 µg/ml
- Efeito positivo da concentração aumentada na dissociação de subunidades
- Não houve diferença entre as bateladas, com ou sem bacteriostáticos
- Maior estabilidade está relacionada à maior concentração de r-hLH.

Exemplo 7 - Estudo de Estabilidade de formulações líquidas multidose

[00128] Com base nos resultados dos exemplos anteriores, quatro formulações descritas na Tabela 19 (SAC/500/BACL, LYS/500/BA, LYS/500/BACL e ARG/500/Phe) foram armazenadas a 2-8° C e +25° C e testadas de acordo com um rigoroso plano de estabilidade e de acordo com os métodos analíticos a seguir:

- RP-HPLC para o conteúdo de LH,
- RP-HPLC para formas oxidadas da subunidade α
- RP-HPLC para conteúdo de fenol
- RP-HPLC para o conteúdo de cloreto de benzalcônio
- RP-HPLC para o conteúdo de álcool de benzila
- SDS-PAGE para subunidades livres e agregados
- Bioensaio
- pH da solução
- Aparência visual

[00129] A quantidade de lisina e arginina nas formulações acima foi ajustada (isto é, monoclórato de L-lisina para 28,5 mg e monoclóri-

drato de L-arginina para 31,5 mg) para otimizar a isotonicidade das formulações.

[00130] Uma análise estatística foi realizada sobre os resultados de todos os parâmetros que foram identificados como indicativos da estabilidade com o auxílio do software Stabileo 1,1.

concentração de r-hLH (por RP-HPLC) em armazenamento a 2-8° C e 25 ± 2° C

[00131] Nenhuma perda estatisticamente significativa na concentração de proteína foi observada para as formulações após 12 meses de armazenamento a 2-8° C. Uma diminuição comum de 0,4 µg/mês foi observada depois de armazenamento de 6 meses a 25 ± 2° C.

bioatividade de r-hLH (bioensaio) sob armazenamento a 2-8° C e 25 ± 2° C

[00132] Nenhuma perda relevante da bioatividade foi observada para as formulações após 12 meses de armazenamento a 2-8° C e 25 ± 2° C.

% de subunidades e agregados por SDS-PAGE

[00133] A percentagem de agregados por SDS-PAGE permanece abaixo de 2% para todas as formulações após armazenamento de 12 meses a 2-8° C e 25° C.

[00134] O percentual de subunidades por SDS-PAGE aumenta acima de 32% após 6 meses a 25° C para todas as formulações.

% de formas oxidadas de RP-HPLC

[00135] SAC/500/BACL e ARG/500/Phe apresentam o menor aumento das formas oxidadas.

pH e aparência

[00136] Nenhuma mudança na aparência (cor, nitidez, partículas visíveis), nem no pH foi observada durante a preparação e após o armazenamento.

Conteúdo de Agentes bacteriostáticos

[00137] As quantidades-alvo de fenol e álcool de benzila foram detectadas e nenhuma perda foi medida a partir de 6 meses a 12 meses de pontos de verificação de estabilidade. Uma quantidade de cloreto de benzalcônio abaixo do alvo (6 µg/ml em vez de 10 µg/ml) foi medida na formulação SAC/500/BACL no ponto de verificação da estabilidade de 6 meses.

Eficácia de agentes bacteriostáticos

[00138] Os resultados dos testes de eficácia bacteriostática, realizados em T = 0 e repetidos após 9 meses nas formulações estão reportados nas Tabelas 30 a 33.

Tabela 30. Resultados do teste de eficácia bacteriostática na formulação de multidoses SAC/500/BACL

Micro-organismo	Redução de log vs T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 dias	T=14 dias	T=28 dias
<i>Staphylococcus aureus</i>	>3	>3	>3	>3	sem redução
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>3	>3	>3	>3	Sem redução
<i>Escherichia coli</i>	não testado	n.t.	>3	>3	Sem redução
<i>Candida albicans</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	Sem aumento
<i>Aspergillus niger</i>	n.t.	n.t.	1.8	>3	Sem aumento

Tabela 31. Resultados do teste de eficácia bacteriostática na formulação de multidoses LYS/500/BACL

Micro-organismo	Redução de log vs T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 dias	T=14 dias	T=28 dias
<i>Staphylococcus aureus</i>	>3	>3	>3	>3	Sem redução
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>3	>3	>3	>3	sem redução
<i>Escherichia coli</i>	não testado	n.t.	>3	>3	Sem redução
<i>Candida albicans</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	sem aumento
<i>Aspergillus niger</i>	n.t.	n.t.	3.3	>3	sem aumento

Tabela 32. Resultados do teste de eficácia bacteriostática na formulação multidoso LYS/500/BA

Micro-organismo	Redução de log vs T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 dias	T=14 dias	T=28 dias
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.05	>3	>3	>3	Sem redução
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>3	>3	>3	>3	Sem redução
<i>Escherichia coli</i>	não testado	n.t.	>3	>3	Sem redução
<i>Candida albicans</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	sem aumento
<i>Aspergillus niger</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	sem aumento

Tabela 33. Resultados do teste de eficácia bacteriostática na formulação de multidoses ARG/500/Phe

Micro-organismo	Redução de log vs T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 dias	T=14 dias	T=28 dias
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.73	>3	>3	>3	Sem redução
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>3	>3	>3	>3	Sem redução
<i>Escherichia coli</i>	não testado	n.t.	>3	>3	Sem redução
<i>Candida albicans</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	sem aumento
<i>Aspergillus niger</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	sem aumento

[00139] As formulações contendo a combinação de 0,3% de álcool de benzila + 0,001% de cloreto de benzalcônio e sacarose ou lisina (SAC/500/BACL e LYS/500/BACL) preencheram os critérios A da Farmacopeia Europeia mesmo se a quantidade de cloreto de benzalcônio estava abaixo do alvo (6 µg/ml em vez de 10 µg/ml).

[00140] Formulação contendo 0,5% de fenol (ARG/500/Phe) e formulação contendo 1,2% de álcool de benzila (LYS/500/BA) preencheram os critérios B da Farmacopeia Europeia.

Conclusões

[00141] Todas as formulações apresentaram um bom perfil de estabilidade após 12 meses de armazenamento a 2-8°C.

Referências

Burgues *et al.*; Subcutaneous self-administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotropic hypogonadism. Spanish Collaborative Group on Male Hypogonadotropic Hypogonadism; *Hum. Reprod.*; **1997**, 12(5): 980-6

Cerpa-Poljak *et al.*; Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity; *Endocrinology*; **1993**, 132(1): 351-356

Dias *et al.*; Receptor binding and functional properties of chimeric human follitropin prepared by an exchange between a small hydrophilic intercysteine loop of human follitropin and human lutropin; *J. Biol. Chem.*; **1994**, 269(41): 25289-25294

Fiddes & Talmadge; Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones; *Recent Prog. Horm. Res.* ; **1984**, 40: 43-78

Flack *et al.*; Site-directed mutagenesis defines the individual roles of the glycosylation sites on follicle-stimulating hormone; *J. Biol. Chem.*; **1994**, 269(19): 14015-14020

Hakola *et al.*; Recombinant rat follicle-stimulating hormone; production by Chinese hamster ovary cells, purification and functional characterization; *Molecular and Cellular Endocrinology*, **1997**, 127(1): 59-69

Keene *et al.*; Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells; *J. Biol. Chem.*; **1989**, 264(9): 4769-4775

Keutmann *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(3): 842-848

Klein *et al.*; Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotrophin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey; *Fertility & Sterility*; **2002**, 77(6): 1248-1255

Klein *et al.*; Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist; *Human Reprod.*; **2003**, 18(1): 50-56

LaPolt *et al.*; Enhanced stimulation of follicle maturation and ovulatory potential by long acting follicle-stimulating hormone agonists with extended carboxyl-terminal peptides; *Endocrinology*; **1992**, *131*(6): 2514-2520

Reichert & Ramsey; Dissociation of human follicle-stimulating hormone. Comparison with luteinizing hormone; *J. Biol. Chem.*; **1975**, *250*(8): 3034-3040

Shome *et al.*; Human follicle stimulating hormone: first proposal for the amino acid sequence of the hormone-specific, beta subunit (hFSHb); *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1974**; *39*(1):203-205

Shome, *et al.*; A reevaluation of the amino acid sequence of human follitropin beta-subunit; *J. Prot. Chem.*; **1988**, *7*(4): 325-339

Steelman *et al.*; Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin; *Endocrinology*; **1953**, *53*(6): 604-616

Talmadge *et al.*; Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic 45 gonadotropin and luteinizing hormone; *Nature*; **1984**, *307*: 37-40;

Valove *et al.*; Receptor binding and signal transduction are dissociable functions requiring different sites on follicle-stimulating hormone; *Endocrinology*; **1994**, *135*(6): 2657-2661

Van Hell *et al.*; Effects of human menopausal gonadotrophin preparations in different 5 bioassay methods; *Acta Endocrinologica*; **1964**, *47*: 409-418

EP 0 211 894

EP0 448 146

EP 0 487 512

EP 0 505 500

EP 0 618 808

EP 0 814 841

EP 0 853 945

WO 85/01958

WO 98/58957

WO 00/04913

WO 01/58493

WO 2004/087213

WO 2004/105788

WO 2004/112826

US 3,119,740

US 5,767,067

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação líquida contendo hormônio luteinizante (LH) ou uma variante do mesmo, caracterizada pelo fato de que a dita formulação compreende um tampão fosfato e uma quantidade estabilizadora de arginina ou sais da mesma numa concentração de 10 a 50 mg/ml e/ou lisina ou sais da mesma numa concentração de 10 a 50 mg/ml.

2. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o hormônio luteinizante (LH) é hormônio luteinizante de ser humano (hLH).

3. Formulação, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de o hormônio luteinizante (LH) é hormônio luteinizante de ser humano recombinante (r-hLH).

4. Formulação, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o hormônio luteinizante (LH) é hormônio luteinizante de ser humano urinário (u-hLH).

5. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o hormônio luteinizante (LH) está presente em uma concentração de cerca de 1 a cerca de 50 µg/ml.

6. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o tampão de fosfato está presente em uma concentração de 1 a 100 mM.

7. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que o tampão de fosfato é preferencialmente um tampão de fosfato de sódio.

8. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um tensoativo.

9. Formulação, de acordo com a reivindicação 8, caracteri-

zada pelo fato de que o tensoativo é Polissorbato 20.

10. Formulação, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o Polissorbato 20 está presente em uma concentração de 0,01 a 10 mg/ml.

11. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que compreende ainda metionina.

12. Formulação, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a metionina está presente em uma concentração de 0,01 a 5,0 mg/ml.

13. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um agente bacteriostático.

14. Formulação, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o agente bacteriostático é selecionado a partir de qualquer um de álcool de benzila, fenol e uma combinação de álcool de benzila e cloreto de benzalcônio.

15. Formulação, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizada pelo fato de que o agente bacteriostático está presente em uma concentração de , 0,005 a , 15 mg/ml.

16. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que compreende ainda água para injeção.

17. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo fato de que possui um pH na faixa de 7,5 a 8,5.

18. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos 25 µg/ml de r-hLH, 1,65 mg/ml de Na₂HP0₄ 2H₂O, 0,104 mg/ml de NaH₂PO₄ H₂O, 31,5 mg/ml de monoclóridrato de L-arginina, 0,05 mg/ml

de Polissorbato 20, 0,5 mg/ml de metionina e 5 mg/ml de fenol.

19. Formulação, acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos 25 µg/ml de r-hLH, 1,65 mg/ml de Na₂HP0₄ 2H₂O, 0,104 mg/ml de NaH₂P0₄ H₂O, 28,5 mg/ml de monoclóridrato de lisina, 0,05 mg/ml de Polissorbato 20, 0,5 mg/ml de metionina e 12 mg/ml de álcool de benzila.

20. Formulações, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos 25 µg/ml de r-hLH, 1,65 mg/ml de Na₂HP0₄ 2H₂O, 0,104 mg/ml de NaH₂P0₄ H₂O, 28,5 mg/ml de lisina, 0,05 mg/ml de Polissorbato 20, 0,5 mg/ml de 3 mg de metionina/ml de álcool de benzila e 0,01 mg/ml de cloreto de benzalcônio.

21. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende a formulação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 20.

22. Forma de apresentação da formulação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizada pelo fato de ser hermeticamente vedada em condições estéreis em um recipiente apropriado para armazenamento antes do uso.

23. Processo para a preparação da formulação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que compreende a diluição do hormônio luteinizante (LH) com uma solução de excipientes.

24. Uso da formulação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento.

25. Uso da formulação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para o tratamento da infertilidade em mu-

lheres e/ou homens.

26. Uso da formulação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de ser em combinação com uma formulação líquida compreendendo hormônio estimulador de folículo (FSH) ou uma variante do mesmo.

27. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizada pelo fato de ser para o tratamento da infertilidade em mulheres e/ou homens.

FIG. 1

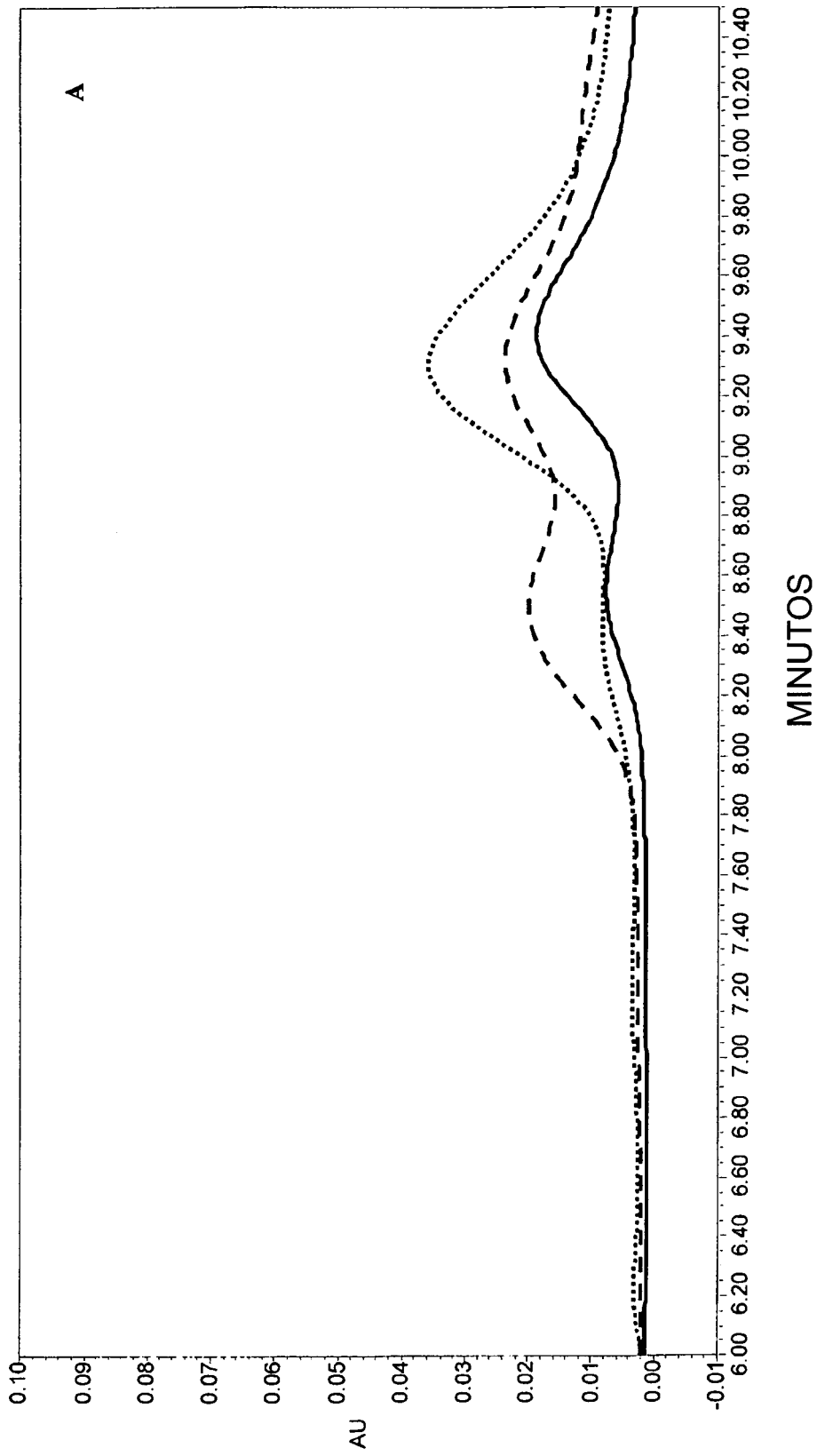


FIG. 1 - Cont.

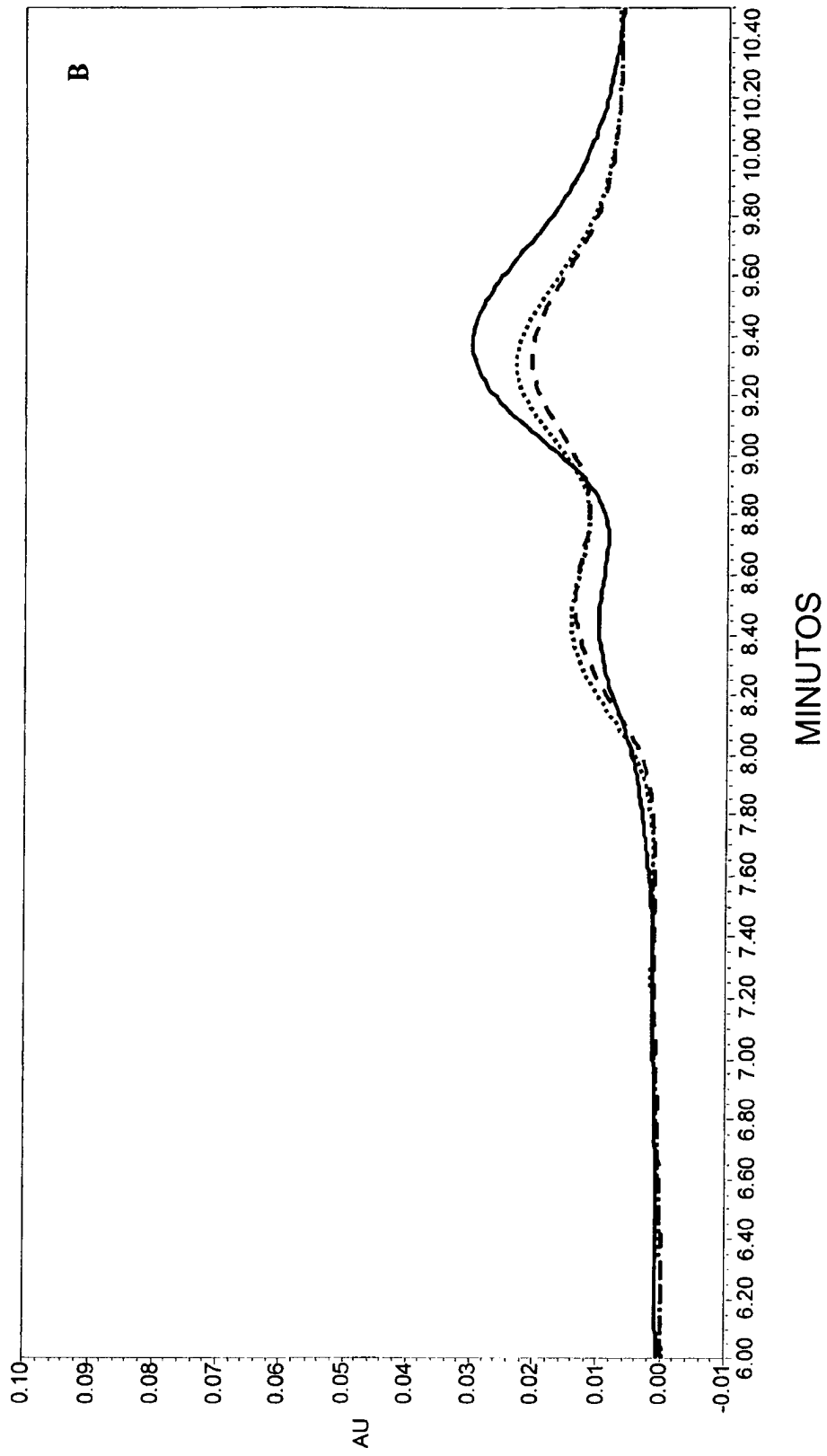


FIG. 1 - Cont.

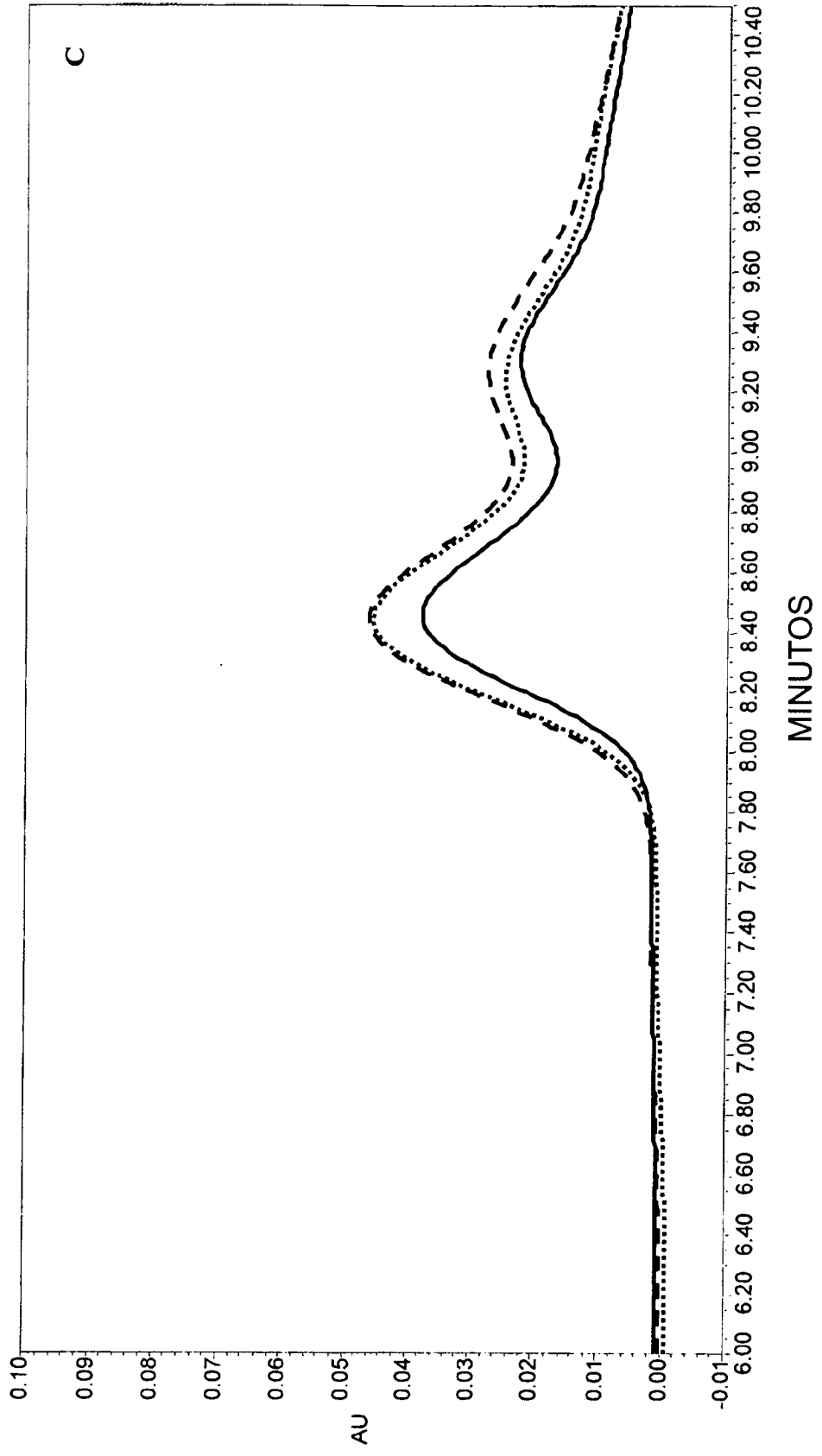


FIG. 1 - Cont.

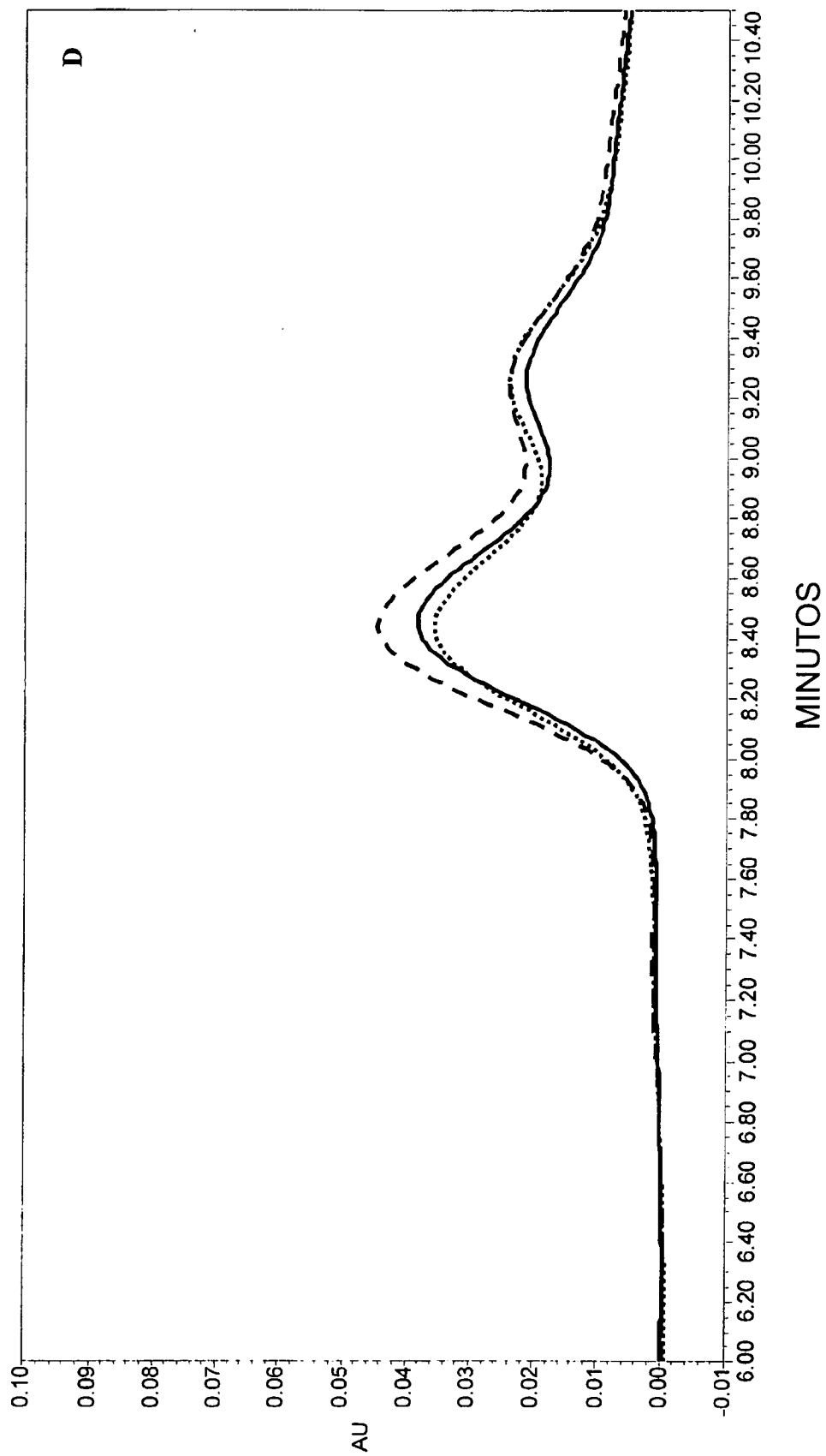


FIG. 1 - Cont.

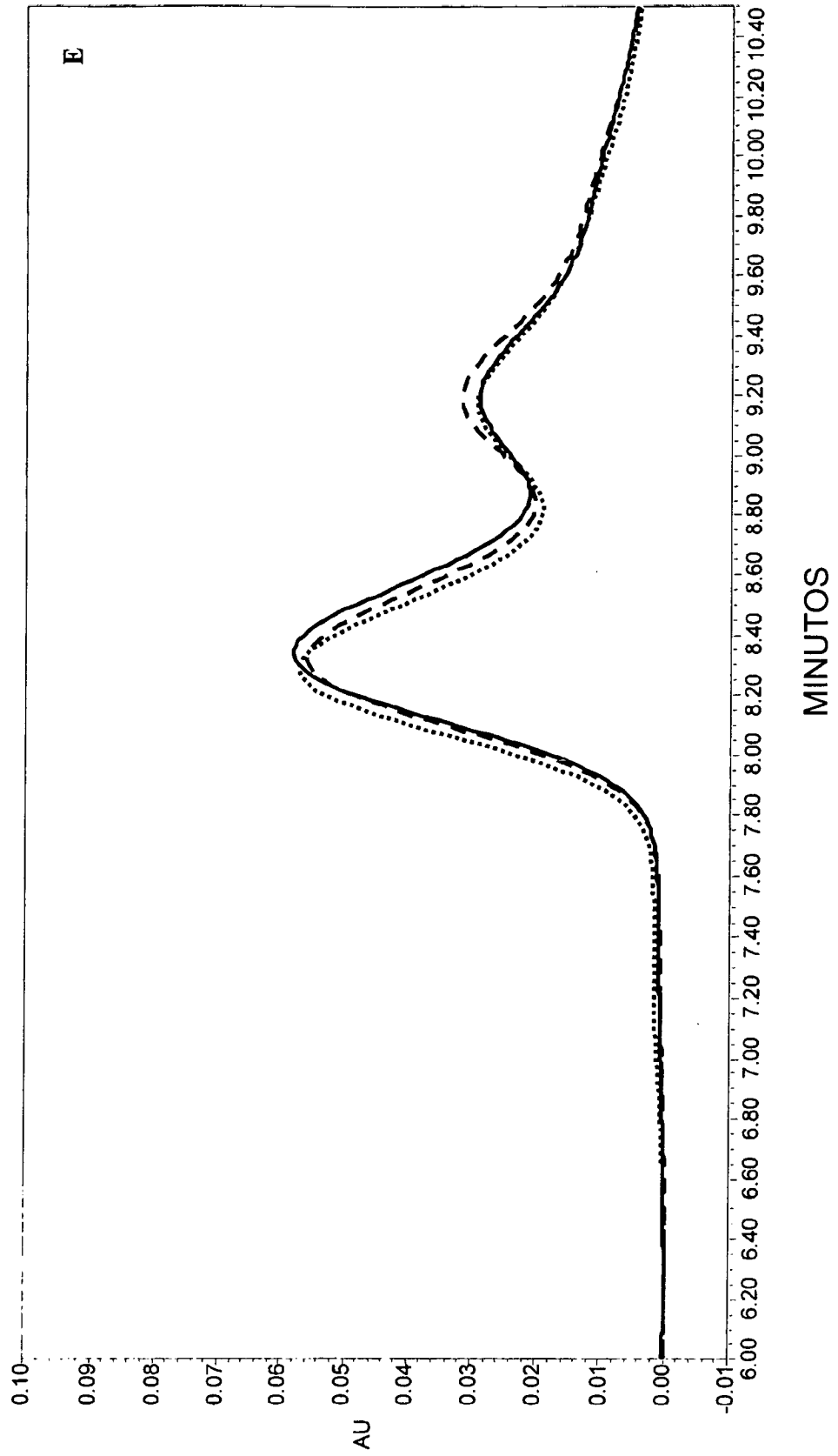


FIG. 1 - Cont.

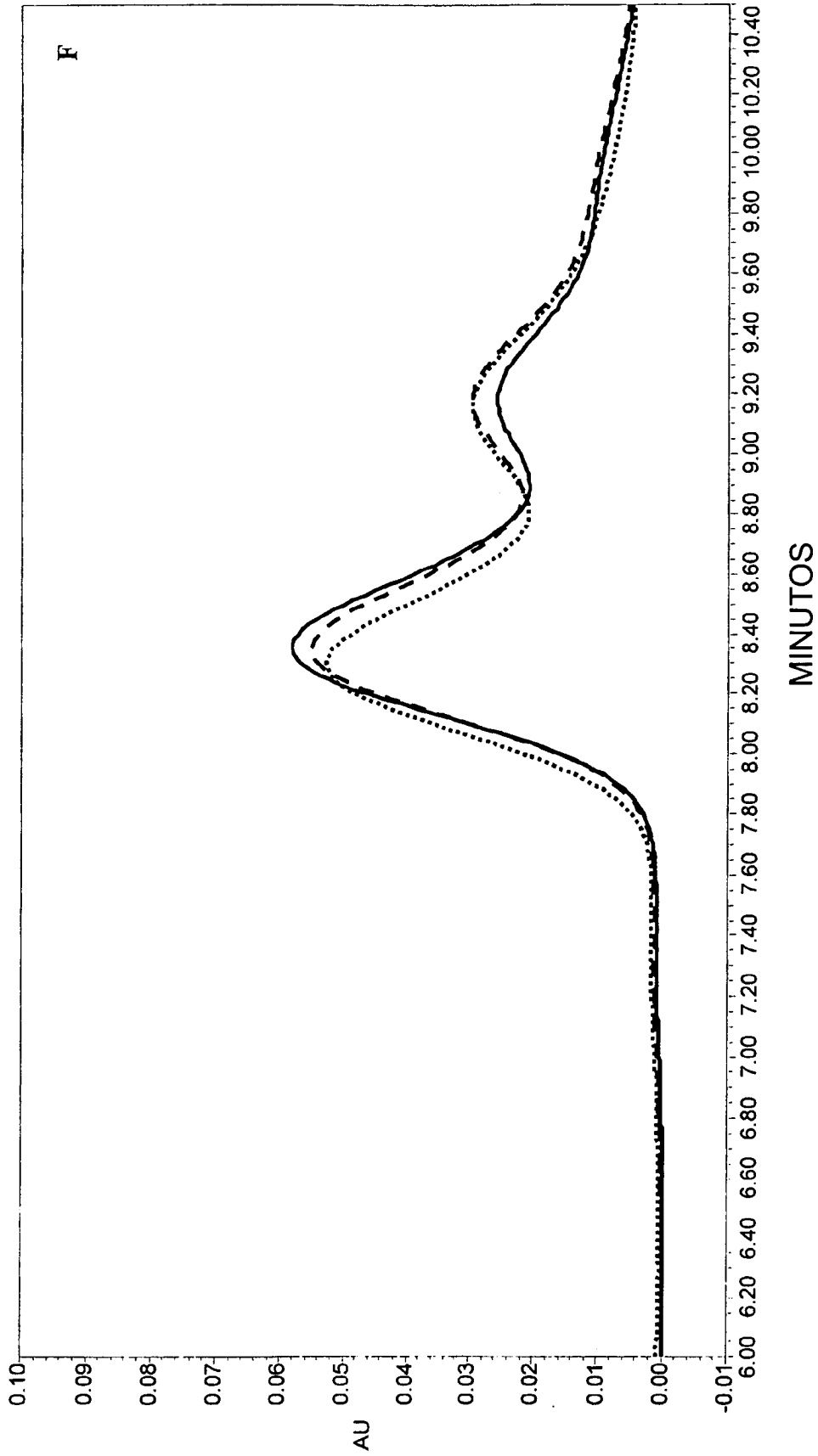


FIG. 2

