

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 233**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 38/24 (2006.01)

A61P 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08844750 .3**

96 Fecha de presentación: **29.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2219607**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2010**

54 Título: **Formulaciones de LH líquidas**

30 Prioridad:

01.11.2007 EP 07119832
28.11.2007 US 4481 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

19.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

19.12.2012

73 Titular/es:

MERCK SERONO S.A. (100.0%)
CENTRE INDUSTRIEL
1267 COINSINS, CH

72 Inventor/es:

AGOSTINETTO, RITA;
SAMARITANI, FABRIZIO;
DEL RIO, ALESSANDRA y
RICHARD, JOEL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 393 233 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de LH líquidas

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de formulaciones farmacéuticas líquidas de hormona luteinizante (LH) así como a métodos para producir tales formulaciones.

Antecedentes de la invención

10 La hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH) y la gonadotropina coriónica (CG) son proteínas inyectables que caen dentro de la clase de gonadotropinas. LH, FSH y CG se usan solas y en combinación en el tratamiento de infertilidad y trastornos reproductivos tanto en pacientes masculinos como femeninos.

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

15 La FSH se usa en pacientes femeninos en la inducción de la ovulación (OI) y en la hiperestimulación ovárica controlada (COH) para las tecnologías de reproducción asistida (ART). En un régimen de tratamiento típico para la inducción de ovulación, se le administra a un paciente inyecciones diarias de FSH o una variante de FSH (alrededor de 75 a 300 IU de FSH/día) durante un periodo de alrededor de 6 a alrededor de 12 días. En un régimen de tratamiento típico para la hiperestimulación ovárica controlada, se le administra a un paciente inyecciones diarias de FSH o una variante de FSH (alrededor de 150-600 IU de FSH/día) durante un periodo de alrededor de 6 a alrededor de 12 días.

20 La FSH se usa también para inducir la espermatogénesis en hombres que padecen oligospermia. Ha tenido éxito un régimen que usa 150 IU de FSH 3 veces a la semana en combinación con 2500 IU de hCG dos veces a la semana consiguiendo una mejora en el recuento de espermatozoides en hombres que padecen hipogonadismo hipogonadotrófico (Burgues et al., 1997).

25 La LH se usa en pacientes femeninos en combinación con FSH en OI y en COH, particularmente en aquellos pacientes que tienen muy bajos niveles de LH endógena o resistencia a LH, tales como mujeres que padecen hipogonadismo hipogonadotrófico (HH, grupo I de la WHO) o pacientes mayores (es decir, de 35 años de edad o mayores), y pacientes en las que es un problema la implantación de embriones o un aborto espontáneo al inicio de embarazo. La LH en combinación con FSH ha estado disponible tradicionalmente en forma de una preparación denominada gonadotropinas menopáusicas humanas (hMG) extraída de la orina de mujeres postmenopáusicas. La hMG tiene una relación 1:1 de actividad de FSH:LH.

30 La CG actúa en el mismo receptor que la LH y provoca las mismas respuestas. La CG tiene una semivida de circulación más larga que la LH y se usa por lo tanto comúnmente como fuente de larga actuación de la actividad de la LH. La CG se usa en regímenes de OI y COH para imitar el pico de LH natural y desencadenar la ovulación. Una inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) se usa para desencadenar la ovulación al final de la estimulación con FSH o una mezcla de FSH y LH. La CG se puede usar también junto con la FSH durante la estimulación para OI y COH, para proporcionar actividad de LH durante la estimulación en pacientes en los que es deseable la actividad de LH, tales como los mencionados anteriormente.

35 FSH, LH y CG son miembros de la familia de la hormona de glicoproteína heterodímero que incluye también la hormona que estimula el tiroides (TSH). Los miembros de esta familia son heterodímeros, que comprenden una subunidad α y una β . Las subunidades se mantienen juntas por medio de interacciones no covalentes. El heterodímero de FSH humana (hFSH) consiste en (i) una subunidad alfa de glicoproteína de 92 aminoácidos madura, que también es común a los otros miembros de la familia humana (es decir, gonadotropina coriónica ("CG"), hormona luteinizante ("LH") y hormona estimulante del tiroides ("TSH")); y (ii) una subunidad beta de 111 aminoácidos madura que es única de FSH (Shome et al., 1974 y 1988). El heterodímero de LH humana consiste en (i) la subunidad alfa de glicoproteína de 92 aminoácidos madura; y (ii) una subunidad beta de 112 aminoácidos madura que es única de LH (Keutmann et al., 1979; Talmadge et al., 1984; Fiddes & Talmadge, 1984). Las subunidades alfa y beta de las glicoproteínas pueden tener tendencia a disociarse en las formulaciones, debido a interacciones con un conservante, tensioactivo y otros excipientes. La disociación de las subunidades conduce a la pérdida de la actividad biológica (Reichert & Ramsey, 1975).

40 La FSH se formula para inyección intramuscular (IM) o subcutánea (SC). La FSH se suministra en forma liofilizada (sólida) en viales o ampollas de 75 IU/vial y 150 IU/vial con una duración de alrededor de dos años cuando se almacena a 2-25°C. Se forma una disolución para inyección reconstituyendo el producto liofilizado con agua para inyección (WFI). Para la inducción de la ovulación o hiperestimulación ovárica controlada, se recomiendan inyecciones diarias con dosis de partida de 75 IU a 600 IU durante hasta diez días. Dependiendo de la respuesta del

- paciente, se puede usar hasta tres ciclos de tratamiento con dosis crecientes de FSH. Con las formulaciones liofilizadas, se requiere que el paciente reconstituya un nuevo vial de material liofilizado con diluyente y se lo administre inmediatamente después de la reconstitución diariamente [Package insert N1700101A, publicado en febrero de 1996, para Fertinex™ (urofolitropina para inyección, purificada) para inyección subcutánea, por Serono Laboratories, Inc., Randolph, MA].
- La FSH se ha formulado también en formatos líquidos tanto de dosis unitaria como de multidosis, en viales o ampollas. Los formatos de dosis unitaria deben permanecer estables y activos en el almacenamiento previamente a su uso.
- Los formatos multidosis no solo deben permanecer estables y activos en el almacenamiento previamente a su uso, sino que deben también permanecer estables, activos y relativamente libres de bacterias durante un periodo de administración de múltiples días, después de que el sello de la ampolla ha sido manipulado. Por este motivo, los formatos multidosis contienen a menudo un agente bacteriostático.
- La LH se formula para inyección intramuscular (IM) o subcutánea (SC). La LH se suministra en forma liofilizada (sólida) en viales o ampollas de 75 IU/vial con una duración de alrededor de dos años cuando se almacena a 2-25°C. Una disolución para inyección se forma reconstituyendo el producto liofilizado con agua para inyección (WFI). Para la inducción de la ovulación o la hiperestimulación ovárica controlada, junto con la FSH, se recomiendan inyecciones diarias con dosis de partida de 75 IU a 600 IU de LH durante hasta alrededor de diez días.
- El documento EP 0 618 808 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) describe una composición farmacéutica que comprende una mezcla íntima sólida de gonadotropina y una cantidad estabilizante de sacarosa sola o en combinación con glicina.
- El documento EP 0 814 841 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) describe una composición farmacéutica líquida estable que comprende gonadotropina coriónica humana recombinante (hCG) y una cantidad estabilizante de manitol.
- El documento WO 2004/087213 (Ares Trading S.A.) describe un líquido y una composición farmacéutica liofilizada que comprende hormona estabilizante del folículo (FSH) o una de sus variantes y/o hormona luteinizante (LH) o una de sus variantes así como un tensioactivo seleccionado de Pluronic® F77, Pluronic F87, Pluronic F88 y Pluronic F68.
- El documento WO 2004/112826 (Ares Trading S.A.) describe una composición liofilizada que comprende hormona estabilizante del folículo (FSH) o una de sus variantes y hormona luteinizante (LH) o una de sus variantes así como un tensioactivo seleccionado de un polisorbato que incluye Tween 20, Tween 40 y Tween 80.
- El documento WO 00/04913 (Eli Lilly and Co.) describe una formulación que comprende FSH o una variante de FSH, que contiene una subunidad alfa y beta, y un conservante seleccionado del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparaben (metil, etil, propil, butil y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroxiacetato de sodio y timerosal, o sus mezclas en un diluyente acuoso.
- El documento WO 2004/105788 (Ferring B.V.) describe una composición farmacéutica que consiste en FSH y hCG en por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- El documento EP 0 448 146 (AKZO N.V.) describe un liofilizado que contiene gonadotropina estabilizada que comprende una gonadotropina y una cantidad estabilizante de una sal de ácido dicarboxílico.
- El documento EP 0 853 945 (Akzo Nobel N.V.) describe una formulación que contiene gonadotropina líquida caracterizada porque la formulación comprende una gonadotropina y cantidades estabilizantes de un ácido policarboxílico o una de sus sales y de un compuesto de tioéter.
- Subsiste una necesidad de formulaciones líquidas estables de LH o una variante de LH para administración en dosis unitaria o multidosis.
- Sumario de la invención**
- Es un objetivo de la invención proporcionar formulaciones líquidas de LH o una variante de LH, métodos para su preparación, y métodos para su uso veterinario o farmacéutico en el tratamiento de trastornos de fertilidad.
- En un primer aspecto, la invención proporciona una formulación líquida de LH o una variante de LH que comprende una preparación purificada de LH o variante de LH, un tampón de fosfato y una cantidad estabilizante de arginina o sus sales y/o lisina o sus sales, según la reivindicación 1.
- En un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una formulación líquida de LH o una variante de LH que comprende las etapas de a) formar una disolución de LH o una variante de LH, y b) añadir a dicha disolución una cantidad estabilizante de arginina o sus sales y/o lisina o sus sales, y tampón de

fosfato, según la reivindicación 23.

5 En un tercer aspecto, la invención proporciona una forma de presentación de una formulación líquida de LH o una variante de LH que comprende la formulación líquida según la invención, herméticamente sellada en condiciones estériles en un recipiente apropiado para almacenamiento previamente al uso según la reivindicación 22. El recipiente puede ser una ampolla, un vial, una jeringuilla, o un cartucho.

10 En un cuarto aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación para uso farmacéutico humano, que comprende material de envasado y un recipiente que comprende la formulación líquida de LH o una variante de LH según la invención y un agente bacteriostático, en la que dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica que tal formulación se puede mantener durante un periodo de veintiocho días o mayor después del primer uso.

Es un objetivo adicional de la invención proporcionar el uso de una formulación líquida de LH o una variante de LH según la invención en combinación con formulaciones líquidas de FSH o una variante de FSH según la reivindicación 26.

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 muestra la comparación de perfiles cromatográficos (por SE-HPLC) de formulaciones de r-hLH con diferentes concentraciones (6, 12 y 24 µg/ml de r-hLH), recipientes (jeringuilla y cartucho) y volúmenes de llenado (0,25, 0,5 y 1 ml). Estas formulaciones, además de r-hLH, contienen tampón de fosfato, sacarosa, Tween 20, metionina, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio y agua para inyección. Las líneas de puntos corresponden a un volumen de llenado de 0,25 ml; las líneas discontinuas corresponden a un volumen de llenado de 0,5 ml; y las líneas negras a un volumen de llenado de 1 ml. (A) 6 µg/ml de formulación de r-hLH en jeringuilla. (B) 6 µg/ml de formulación de r-hLH en cartucho. (C) 12 µg/ml de formulación de r-hLH en jeringuilla. (D) 12 µg/ml de formulación de r-hLH en cartucho. (E) 24 µg/ml de formulación de r-hLH en jeringuilla. (F) 24 µg/ml de formulación de r-hLH en cartucho. Los picos a un tiempo de retención de 8,5 minutos corresponden a los heterodímeros intactos (subunidades alfa+beta unidas por un enlace no covalente), mientras que los picos a más alto tiempo retención (alrededor de 9,5 minutos) corresponden a las subunidades libres. AU: unidad de absorbancia.

20 La Figura 2 muestra la comparación del porcentaje de heterodímeros calculado por SE-HPLC en la formulación con y sin la combinación de agentes bacteriostáticos, respectivamente SAC/500/24µgBACL_cart y SAC/500/24µg_cart. (A) SE-HPLC realizada después de tres días (3d) con almacenamiento a +40°C. (B) SE-HPLC realizada después de ocho días (8d), cuatro semanas (4w), seis semanas (6w), ocho semanas (8w) y trece semanas (13w) con almacenamiento a +33°C.

Descripción detallada de la invención

Las formulaciones de LH líquida de la presente invención tienen estabilidad o propiedades mejoradas o más apropiadas, y son útiles para el tratamiento de infertilidad en mujeres y/o hombres.

35 En una realización preferida las formulaciones líquidas de la invención son para inyección subcutánea y/o intramuscular.

La estabilidad o propiedades apropiadas de las formulaciones líquidas de LH o una variante de LH según la invención se obtienen previniendo o reduciendo la pérdida de actividad o estabilidad, o mejorando cualquier aspecto de la efectividad o deseabilidad de administración, por ejemplo, por lo menos por una de modo, frecuencia, dosis, confort, facilidad de uso, y similares.

40 La hormona luteinizante, o LH, como se usa aquí se refiere a la LH producida en forma de proteína madura completa, que incluye, pero no está limitada a LH humana o "hLH", producida recombinantemente o aislada de fuentes humanas, tales como la orina de mujeres postmenopáusicas.

45 La expresión "variante de LH" se pretende que incluya aquellas moléculas que difieren en secuencia de aminoácidos, patrón de glicosilación o en unión entre subunidades de la LH humana pero que exhiben la actividad de la LH.

El término "actividad" con relación a LH, se refiere a la capacidad de una formulación de LH o una formulación mixta, para provocar respuestas biológicas asociadas a LH, tales como el método de ganancia de peso de la vesícula seminal (Van Hell et al., 1964). La actividad biológica de LH se evalúa con respecto a un estándar aceptado para LH.

50 La medida de actividad se expresa en unidades internacionales por mililitro de disolución (IU/ml) o en mega unidades internacionales por mililitro de disolución (MIU/ml). (1 MIU/ml = 1.000.000 IU/ml). Una unidad internacional se calcula como se describe en la Research Reference Reagent Note No. 35, publicada por el National Institute of Health, Bethesda, Maryland.

La LH o una variante de LH se puede producir por cualquier método apropiado, tal como recombinantemente, por

aislamiento o purificación de fuentes naturales como puede ser el caso, o por síntesis química, o una de sus combinaciones.

5 El uso del término "recombinante" se refiere a preparaciones de LH o una variante de LH que se producen por medio del uso de una tecnología de ADN recombinante (véase por ejemplo, el documento WO 85/01958). Un ejemplo de un método de expresar LH usando tecnología recombinante es por transfección de células eucariotas con las secuencias de ADN que codifican una subunidad alfa y beta de LH, proporcionadas en un vector o en dos vectores teniendo cada subunidad un promotor separado, como se describe en las patentes europeas nos. EP 0 211 894 y EP 0 487 512.

10 Otro ejemplo del uso de tecnología recombinante para producir LH es por el uso de recombinación homóloga para insertar un segmento regulador heterólogo en conexión operativa a secuencias endógenas que codifican las subunidades de LH, como se describe en la patente europea no. EP 0 505 500 (Applied Research Systems ARS Holding NV).

15 La hormona de estimulación del folículo, o FSH, como se usa aquí se refiere a la FSH producida como proteína madura completa que incluye, pero no está limitada a FSH humana o "hFSH", producida recombinantemente o aislada de fuentes humanas, tales como la orina de mujeres postmenopáusicas.

La expresión "variante de FSH" se desea que incluya aquellas moléculas que difieren en secuencia de aminoácidos, patrón de glicosilación o unión inter-subunidades del FSH humana pero que exhiben actividad de FSH.

20 El término "actividad" con relación a la FSH, se refiere a la capacidad de una formulación de FSH o una formulación mixta, para provocar respuestas biológicas asociadas a FSH, tales como ganancia de peso ovárico en el ensayo de Steelman-Pohley (Steelman et al., 1953), o crecimiento folicular en una paciente femenina. El crecimiento folicular en un paciente femenino se puede evaluar por ultrasonidos, por ejemplo, respecto al número de folículos que tienen un diámetro medio de o alrededor de 16 mm el día 8 de estimulación. La actividad biológica se evalúa con respecto a un estándar aceptado para FSH.

25 Los ejemplos de variante de FSH incluyen CTP-FSH, una FSH recombinante modificada de larga actuación, que consiste en la subunidad α natural y una subunidad β híbrida en la que el péptido carboxiterminal de hCG se ha condensado con el C terminal de la subunidad β de FSH, como se describe en LaPolt et al. (1992) o en Klein et al. (2003). También está incluida la CTP-FSH de cadena única, una molécula de una sola cadena, que consiste en las siguientes secuencias (de N terminal a C terminal)

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

30 en la que β FSH significa la subunidad β de FSH, hCG-CTP(113-145) significa el péptido carboxiterminal de hCG y α FSH significa la subunidad α de FSH, como se describe por Klein et al., (2002).

35 Otros ejemplos de variantes de FSH incluyen moléculas de FSH que tienen sitios de glicosilación adicional incorporados en la subunidad α y/o β , como se describe en el documento WO 01/58493 (Maxygen), particularmente como se describe en las reivindicaciones 10 y 11 del documento WO 01/58493, y moléculas de FSH con enlaces S-S inter-subunidad, como se describe en el documento WO 98/58957.

La FSH o variante de FSH se puede producir por cualquier método apropiado, tal como recombinantemente, por aislamiento o purificación de fuentes naturales según sea el caso, o por síntesis química, o cualquiera de sus combinaciones.

40 La FSH o variante de FSH usada según la presente invención se puede producir no solo por medios recombinantes, incluyendo de células de mamífero, sino también se puede purificar de otras fuentes biológicas, tales como de fuentes urinarias. Las metodologías aceptables incluyen las descritas en Hakola et al. (1997), Keene et al. (1989), Cerpa-Poljak et al. (1993), Dias et al. (1994); Flack et al. (1994), Valove et al. (1994), patente de EE.UU. 3.119.740 y patente de EE.UU. no. 5.767.067.

45 El término "administrar" o "administrando" quiere decir introducir una formulación de la presente invención en el cuerpo de un paciente que la necesite para tratar una enfermedad o estado.

El término "paciente" quiere decir un mamífero que es tratado de una enfermedad o estado. Los pacientes son, pero no están limitados al siguiente origen, humano, ovino, porcino, equino, bovino, conejo y similares.

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

Un “agente de isotonicidad” es un compuesto que es fisiológicamente tolerado e imparte una tonicidad apropiada a una formulación para prevenir el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación.

5 Los compuestos tales como glicerina, se usan comúnmente para tales propósitos en concentraciones conocidas. Otros agentes de isotonicidad apropiados incluyen, pero no están limitados a, aminoácidos o proteínas (por ejemplo, glicina o albúmina), sales (por ejemplo, cloruro de sodio), y azúcares (por ejemplo, dextrosa, sacarosa y lactosa).

10 El término “bacteriostático” o “agente bacteriostático” se refiere a un compuesto o composiciones añadidas a una formulación para actuar como un agente antibacteriano. Una formulación que contiene LH o una variante de LH conservada de la presente invención preferentemente cumple las pautas reguladoras o reglamentarias de efectividad de conservación para ser un producto multiuso comercialmente viable, preferentemente en seres humanos.

Los ejemplos de bacteriostáticos incluyen fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparaben (metil, etil, propil, butil y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal.

15 El término “tampón” o “tampón fisiológicamente aceptable” se refiere a disoluciones de compuestos que se sabe que son seguros para uso veterinario o farmacéutico en formulaciones, que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación en un intervalo de pH deseado para la formulación. Los tampones aceptables para controlar el pH desde un pH moderadamente ácido hasta un pH moderadamente básico incluyen, pero no están limitados a, compuestos tales como fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS, e histidina. “TRIS” se refiere a 2-amino-2-
20 hidroximetil-1,3-propanodiol, y a cualquiera de sus sales farmacológicamente aceptable. Los tampones preferibles son tampones de fosfato con disolución salina o una sal aceptable.

25 La expresión “tampón de fosfato” se refiere a disoluciones que contienen ácido fosfórico o sus sales, ajustadas a un pH deseado. Generalmente los tampones de fosfato se preparan a partir de ácido fosfórico, o una sal de ácido fosfórico, que incluye pero no está limitada a sales de sodio y potasio. Varias sales de ácido fosfórico son conocidas en la técnica, tales como sales monobásicas, dibásicas y tribásicas de sodio y potasio. Se sabe que las sales de ácido fosfórico están en forma de hidrato de la sal dada. Los tampones de fosfato pueden cubrir un intervalo de pH tales como de alrededor de pH 4 a alrededor de pH 10, y los intervalos preferidos de alrededor de pH 5 a alrededor de pH 9, y un intervalo más preferido de alrededor de 7,5 a alrededor de 8,5, lo más preferentemente a o alrededor de pH 8,0.

30 El término “vial” o “recipiente” se refiere ampliamente a un recipiente apropiado para retener LH y diluyente en un estado estéril contenido. Los ejemplos de un vial como se usa aquí incluyen ampollas, cartuchos, envases blíster, u otros recipientes apropiados para suministro de la LH a un paciente vía jeringuilla, bomba (incluyendo osmótica), catéter, parche transdérmico, pulverizador pulmonar o transmucosa. Los viales apropiados para envasar productos para administración parenteral, pulmonar, transmucosa o transdérmica son bien conocidos y reconocidos en la
35 técnica.

El término “estabilidad” se refiere a la estabilidad física, química y conformacional de la LH en las formulaciones de la presente invención (incluyendo el mantenimiento de la actividad biológica). La inestabilidad de una formulación de proteína puede estar causada por la degradación química o agregación de moléculas de proteína para formar polímeros de orden superior, por disociación de los heterodímeros en monómeros, desglucosilación, modificación de la glicosilación, oxidación (particularmente de la subunidad α) o cualquier otra modificación estructural que reduce por lo menos una actividad biológica de un polipéptido de LH incluido en la presente invención.

40 Una disolución o formulación “estable” es una en la que el grado de degradación, modificación, agregación, pérdida de actividad biológica y similares, de las proteínas en ella está aceptablemente controlado, y no se incrementa inaceptablemente con el tiempo. Preferentemente la formulación retiene por lo menos alrededor de 80% de la actividad de LH marcada durante un periodo de 6 meses a una temperatura de alrededor de 1-10°C, más preferentemente alrededor de 2-8°C, más preferentemente alrededor de 4-5°C. La actividad de LH se puede medir usando el bioensayo⁶ de ganancia de peso de la vesícula seminal.

50 El término “tratamiento” se refiere a la administración, seguimiento, gestión y/o cuidado de un paciente para el que la administración de LH es deseable con el propósito de la estimulación testicular o folicular o de cualquier otra respuesta fisiológica regulada por la LH. El tratamiento puede incluir de este modo, pero no está limitado a, la administración de LH para la inducción o mejora de la calidad del esperma, estimulación de desprendimiento de testosterona en un macho, o el desarrollo folicular o para inducción de la ovulación en la hembra.

55 La expresión “uso multidosis” se desea que incluya el uso de una sola ampolla, vial o cartucho de una formulación de LH para más de una inyección, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más inyecciones. Las inyecciones se efectúan preferentemente durante un periodo de por lo menos alrededor de 12 horas, 24 horas, 48 horas, etc., preferentemente hasta un periodo de o alrededor de 28 días.

Las inyecciones se pueden espaciar en el tiempo, por ejemplo, en un periodo de 6, 12, 24, 48 o 72 horas.

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

Se ha encontrado que un aminoácido seleccionado del grupo de arginina, lisina o una mezcla de una de sus sales es un agente estabilizante apropiado para preparar una formulación líquida estable que comprende LH. Por lo tanto, el primer aspecto de la invención se refiere a una formulación de gonadotropina líquida que contiene hormona luteinizante (LH) o una de sus variantes caracterizada porque dicha formulación comprende una cantidad estabilizante de arginina o sus sales y/o lisina o sus sales.

La concentración de arginina o sus sales es de 10 mg/ml a 50 mg/ml, más preferentemente de alrededor de 20 mg/ml a alrededor de 40 mg/ml, más particularmente preferentemente de alrededor de 25 mg/ml a alrededor de 35 mg/ml, lo más preferentemente alrededor de 31,5 mg/ml.

La concentración de lisina o sus sales es de 10 mg/ml a 50 mg/ml, más preferentemente de alrededor de 20 mg/ml a alrededor de 40 mg/ml, más particular y preferentemente de alrededor de 25 mg/ml a alrededor de 35 mg/ml, lo más preferentemente alrededor de 28,5 mg/ml.

La hormona luteinizante (LH) dentro de la formulación líquida está preferentemente presente a una concentración de alrededor de 1 a alrededor de 50 µg/ml de la formulación total.

En una realización, la hormona luteinizante (LH) está presente en una concentración de alrededor de 1 a 15 µg/ml de la formulación total, en particular cuando se desea para un solo uso.

En una realización adicional, la hormona luteinizante (LH) está presente en una concentración de alrededor de 15 a alrededor de 30 µg/ml de la formulación total, en particular cuando se usa para uso múltiple (multidosis).

La concentración de LH en la formulación es preferentemente de alrededor de 20 IU/ml a alrededor de 2.000 IU/ml, más preferentemente de alrededor de 50 a alrededor de 1.000 IU/ml, más particular y preferentemente de alrededor de 100 IU/ml a alrededor de 600 IU/ml.

Preferentemente la LH se produce recombinantemente, particular y preferentemente se produce en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con un vector o vectores de expresión que comprenden ADN que codifica la subunidad alfa de glicoproteína humana y la subunidad beta de LH. La codificación de ADN de las subunidades beta y alfa puede estar presente en los mismos o diferentes vectores.

La LH recombinante tiene varias ventajas sobre sus homólogas urinarias. Las técnicas de cultivo y aislamiento usando células recombinantes permiten la consistencia entre lotes. En contraste, la LH urinaria varía enormemente de lote a lote en características tales como pureza, patrón de glicosilación, sililación y oxidación de las subunidades. Debido a la mayor consistencia lote a lote y pureza de la LH recombinante, las hormonas se pueden identificar y cuantificar fácilmente usando técnicas tales como clasificación isoelectrica (IEF). La facilidad con la que se puede identificar y cuantificar la LH recombinante permite el relleno de viales con masa de hormona (llenado por masa) en lugar de relleno por bioensayo.

Preferentemente las formulaciones líquidas de la presente invención tienen un tampón, preferentemente un tampón de fosfato, siendo los contraiones preferidos los iones sodio o potasio. Los tampones salinos de fosfato son bien conocidos en la técnica, tales como la disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco. Las concentraciones de tampón en la disolución total pueden variar entre alrededor de 1 mM, 5 mM, 9,5 mM, 10mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM y 500 mM. Preferentemente la concentración de tampón es de alrededor de 10 mM. Es particularmente preferido un tampón 10 mM de iones fosfato con un pH de alrededor de 8,0.

Preferentemente el tampón se ajusta de tal modo que las formulaciones líquidas de la presente invención tienen un pH entre alrededor de 7,0 y alrededor de 9,0, más preferentemente de alrededor de 7,5 a alrededor de 8,5, incluyendo alrededor de pH 7,8, pH 8,0 y 8,2. La invención se refiere a formulaciones líquidas de LH o una variante de LH que puede ser de dosis unitaria o multidosis.

Las formulaciones de LH líquidas de la invención que se desean para uso multidosis comprenden un agente bacteriostático, tal como fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparaben (metil, etil, propil, butil, y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal. Son preferidos alcohol bencílico, fenol y combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio. El agente bacteriostático se usa en una cantidad que dará una concentración que es efectiva para mantener la formulación esencialmente libre de bacterias (apropiada para inyección) durante el periodo de inyección multidosis, que puede ser de alrededor de 12 a 24 horas o de alrededor de 12 a 14 días, preferentemente de alrededor de 6 a alrededor de

28 días.

- 5 El agente bacteriostático está preferentemente presente en una concentración de alrededor de 0,005 a alrededor de 15 mg/ml, más preferentemente de alrededor de 0,01 a alrededor de 12 mg/ml. El agente bacteriostático está preferentemente presente en una concentración de alrededor de 0,1% (masa de bacteriostato/masa de disolvente) a alrededor de 2,0%, más preferentemente de alrededor de 0,2% a alrededor de 1,0%.
- En el caso de alcohol bencílico, es particularmente preferida una concentración de 0,9% o 1,2%. En el caso de fenol, es particularmente preferida alrededor de 0,5%. En el caso de combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio, es particularmente preferida una concentración de 0,3% y 0,001%, respectivamente.
- 10 Preferentemente las formulaciones de la invención contienen un antioxidante, tal como metionina, bisulfito de sodio, sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), hidroxitolueno butilado (BHT), y anisol hidroxibutilado (BHA). La más preferida es metionina. El antioxidante previene la oxidación de LH (particularmente la subunidad α).
- El antioxidante, por ejemplo, metionina está preferentemente presente en una concentración de alrededor de 0,01 a alrededor de 5,0 mg/ml, más preferentemente de alrededor de 0,05 a alrededor de 0,5 mg/ml.
- 15 Preferentemente las formulaciones de la invención contienen un tensioactivo. Preferentemente el tensioactivo se selecciona del grupo de polisorbatos, en particular Tween 20 (polioxietileno (20) sorbitan monolaurato), Tween 40 (polioxietileno (20) sorbitan monopalmitato) y Tween 80 (polioxietileno (20) sorbitan monooleato). El más preferido es Tween 20, preferentemente a una concentración de alrededor de 0,01 a alrededor de 10 mg/ml.
- 20 En una realización preferida las formulaciones de la invención comprenden por lo menos 25 $\mu\text{g/ml}$ de r-hLH, 1,65 mg/ml de Na_2HPO_4 , 0,104 mg/ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 31,5 mg/ml de arginina monohidrocloreto, 0,05 mg/ml de Tween 20, 0,5 mg/ml de metionina y 5 mg/ml de fenol.
- En otra realización preferida las formulaciones de la invención comprenden por lo menos 25 $\mu\text{g/ml}$ de r-hLH, 1,65 mg/ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,104 mg/ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28,5 mg/ml de monohidrocloreto de lisina, 0,05 mg/ml de Tween 20, 0,5 mg/ml de metionina y 12 mg/ml de alcohol bencílico.
- 25 En otra realización preferida las formulaciones de la invención comprenden por lo menos 25 $\mu\text{g/ml}$ de r-hLH, 1,65 mg/ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,104 mg/ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28,5 mg/ml de monohidrocloreto de lisina, 0,05 mg/ml de Tween 20, 0,5 mg/ml de metionina, 3 mg/ml de alcohol bencílico y 0,01 mg/ml de cloruro de benzalconio.
- 30 En una realización preferida la invención proporciona una composición farmacéutica líquida, para su uso en multidosis, que comprende LH o una variante de LH, un agente estabilizante seleccionado del grupo de arginina, lisina o una de sus mezclas o sus sales, y un agente bacteriostático seleccionado de alcohol bencílico, fenol, y una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio.
- 35 En una realización preferida adicional, la invención proporciona un método para fabricar una composición farmacéutica líquida, para su uso en multidosis, que comprende formar una disolución acuosa de LH o una variante de LH, un agente estabilizante seleccionado del grupo de arginina, lisina, o una de sus mezclas o sus sales, y un agente bacteriostático seleccionado de alcohol bencílico, fenol y una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio, y WFI (agua para inyección).
- 40 En otra realización preferida más, la invención proporciona un artículo de fabricación para uso farmacéutico humano, que comprende un vial que comprende una disolución de LH o una variante de LH, un agente estabilizante seleccionado del grupo de arginina, lisina o una de sus mezclas o sus sales, y un agente bacteriostático seleccionado de alcohol bencílico, fenol, y una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio, y una etiqueta que dice que tal disolución se puede mantener durante un periodo de alrededor de veinticuatro horas o más después del primer uso. Preferentemente la etiqueta dice que la disolución se puede mantener hasta alrededor de 12 o 14 días después del primer uso.
- 45 Antes del primer uso, es decir antes de que se rompa el sello del vial, ampolla o cartucho, las formulaciones de la invención se pueden mantener durante por lo menos alrededor de 6 meses, 12 meses o 24 meses.
- 50 En condiciones de almacenamiento preferido, antes del primer uso, las formulaciones se mantienen lejos de la luz brillante (preferentemente en la oscuridad), a temperaturas alrededor de 2-8°C, más preferentemente alrededor de 4-5°C.
- Como se advirtió anteriormente, la invención proporciona formulaciones líquidas de LH o una variante de LH para uso unitario y uso multidosis, que contienen un bacteriostático. Las formulaciones de la invención son apropiadas

para uso veterinario o farmacéutico.

5 Como se advirtió anteriormente, en una realización preferida, la invención proporciona un artículo de fabricación, que comprende material de envasado y un vial que comprende una disolución de LH o una variante de LH, un agente estabilizante seleccionado del grupo de arginina, lisina o una de sus mezclas o sus sales, un agente bacteriostático seleccionado de alcohol bencílico, fenol, y una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio, opcionalmente con tampones y/u otros excipientes, en un diluyente acuoso, en la que dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica que dicha disolución se puede mantener durante un periodo de veinticuatro horas o más después del primer uso.

10 Preferentemente las formulaciones de la invención retienen por lo menos alrededor de 80% de la actividad de la LH en el momento del envasado durante un periodo de 24 meses (antes del primer uso). La actividad de la LH se puede medir usando el bioensayo⁵ de ganancia de peso de la vesícula seminal de rata.

15 Las formulaciones de la presente invención se pueden preparar por un procedimiento que comprende mezclar LH o una de sus variantes y una cantidad estabilizante de arginina o sus sales y/o lisina o sus sales, y opcionalmente un agente bacteriostático seleccionado de alcohol bencílico, fenol, y una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio en forma de sólidos o disolviendo LH o una de sus variantes y una cantidad estabilizante de arginina o sus sales y/o lisina o sus sales, y opcionalmente un agente bacteriostático seleccionado de alcohol bencílico, fenol, y una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio en un diluyente acuoso. La mezcla de componentes y su disolución en un diluyente acuoso se lleva a cabo usando procedimientos convencionales de mezcla y disolución.
20 Para preparar una formulación apropiada, por ejemplo, una cantidad medida de LH o variante de LH en disolución tamponada se combina con arginina o sus sales y/o lisina o sus sales y opcionalmente un bacteriostático seleccionado de alcohol bencílico, fenol, y una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio en una disolución tamponada en cantidades suficientes para proporcionar la proteína, arginina o sus sales y/o lisina o sus sales y el opcional bacteriostático en las concentraciones deseadas. La disolución resultante se dispensa a continuación en viales, ampollas o cartuchos. Las variaciones de este procedimiento serían reconocidas por uno de
25 experiencia media en la técnica.

Por ejemplo, el orden en el que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y pH a la que se prepara la formulación, son todos los factores que pueden ser optimizados para la concentración y medios de administración usados.

30 En una realización preferida, las formulaciones de la invención se hacen preparando disoluciones patrón individuales de concentración conocida de todos los componentes de la formulación (por ejemplo, tampón de fosfato de sodio, arginina o sus sales y/o lisina o sus sales, Tween 20, metionina, LH), y tomando alícuotas de cantidades volumétricas para formar una "disolución madre" de la misma composición que la formulación final. La "disolución madre" se filtra preferentemente a través de una membrana de PDF de 0,22 micrómetros Duroapore® (Millipore), para retirar microorganismos, y a continuación se dispensan las alícuotas en recipientes individuales, tales como
35 viales, ampollas o cartuchos.

Las formulaciones de la presente invención se pueden usar en combinación con formulaciones que comprenden FSH o una variante de FSH (por ejemplo, Gonal-F®).

40 Las formulaciones de la presente invención se pueden administrar usando dispositivos reconocidos. Los ejemplos que comprenden estos sistemas de un solo vial incluyen dispositivos de pluma de inyección para suministro de una disolución tales como EasyJect®, Gonal-F® Pen, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen® y OptiPen®.

45 Los productos reivindicados en este momento incluyen material de envasado. El material de envasado proporciona, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones en las que se puede usar el producto. Para el producto en disolución de un solo vial la etiqueta indica que tal disolución se puede almacenar después del primer uso durante un periodo de veinticuatro horas o más, preferentemente durante hasta 12 o 14 días. Los productos reivindicados en este momento son útiles para uso farmacéutico humano.

Los siguientes ejemplos se proporcionan meramente para ilustrar adicionalmente la preparación de las formulaciones y composiciones de la invención. No se interpretará que el alcance de la invención consiste meramente en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Materiales

Producto	Fabricante
r-hLH a granel	Laboratoires Serono SA
Monohidrocloruro de L-arginina	Merck, código 101544
Cloruro de benzalconio	Fluka, código 12063
Alcohol bencílico	Merck, código 100987
m-Cresol	Merck, código 809691
L-glicina	Merck, código 500190
Monohidrocloruro de L-lisina	Merck, código 105701
Metionina	Merck, código 105707
Fenol	Merck, código 100200
Acido ortofosfórico 85% (Ph Eur, BP, NF)	Merck, código 100563
Hidróxido de sodio	Merck, código 106498
Hidrogenofosfato de disodio dihidrato	Merck, código 106580
Dihidrogenofosfato de sodio monohidrato	Merck, código 106346
Sulfato de sodio anhidro	Merck, código 1006649
Sorbitol	Sigma, código S-1876
Sacarosa	Merck, código 107653
Trehalosa	Merck, código 108216
Tween 20	Merck, código 822184
Agua	miliQ

- 5 El siguiente estudio evaluó los siguientes parámetros para un gran número de formulaciones:
- . Investigación de agentes estabilizantes y/o bacteriostáticos
 - . Compatibilidad con formulaciones de FSH
 - . Compatibilidad con el envasado primario
 - . Perfil de estabilidad después del almacenamiento
- 10 Las formulaciones eran formulaciones líquidas monodosis y multidosis. Se evaluaron los siguientes seis agentes estabilizantes:
- . Monohidrocloruro de L-arginina (ARG o arginina en los ejemplos)
 - . Monohidrocloruro de L-lisina (LYS o lisina en los ejemplos)
 - Trehalosa (TRE)
- 15
- . L-glicina (GLY o glicina en los ejemplos)
 - . Sacarosa (SAC)
 - . Sorbitol (SOR).

Se evaluaron los siguientes cuatro agentes bacteriostáticos para las formulaciones multidosis:

- . Alcohol bencílico (BA).
 - . m-Cresol (mCr).
 - . Fenol (Phe).
- 5 . Combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio (BACL).

Ejemplo 1 – Investigación de agentes estabilizantes para formulaciones monodosis

Se analizaron seis agentes estabilizantes (sacarosa, arginina, glicina, lisina, sorbitol y trehalosa) para dar formulaciones monodosis estables. Las formulaciones analizadas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de varias formulaciones monodosis de r-hLH que contienen diferentes agentes estabilizantes.

Componentes Cantidad/ml	SAC/250	ARG/250	GLY/250	LYS/250	SOR/250	TRE/250
r-hLH a granel	6 µg					
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg					
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg					
Metionina	250 µg					
Tween 20	50 µg					
Sacarosa	105 mg	-	-	-	-	-
Arginina	-	33 mg	-	-	-	-
Glicina	-	-	23 mg	-	-	-
Lisina	-	-	-	28 mg	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	56,5 mg	-
Trehalosa	-	-	-	-	-	106 mg
WFI	q.s. hasta 1 ml					

q.s. = cantidad suficiente

10

Se prepararon alrededor de 40 ml de cada disolución, se filtraron a través de una membrana de 0,22 µm en un recipiente de acero inoxidable de 22 ml, y se almacenaron a 2-8°C, +25°C y 40°C en tubos de plástico de 15 ml. Las disoluciones se analizaron para ver el contenido de proteína (por SE-HPLC), las formas oxidadas (por RP-HPLC), agregados (por SE-HPLC) y la formación de subunidades (cualitativamente, por SE-HPLC) hasta 1 mes. Los resultados del panel completo de los análisis aplicados a este conjunto de formulaciones se dan en las Tablas 2 a 5.

15

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

Formulación	% de heterodímeros			% de subunidades libres			% de agregados		
	T=0	T=1d	T=4d	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=tiempo; d=día(s)

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

Formulación	% de heterodímeros			% de subunidades libres			% de agregados		
	T=0	T=7d	T=1M	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 = mes

Tabla 4. % de formas oxidadas por RP-HPLC

Formulación	12 días (+40°C)	1 mes (+25°C)
SAC/250	7,62	21,84
GLY/250	7,46	n.a.
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.a. = no disponible

Tabla 5. contenido de r-hLH por SE-HPLC

Formulación	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

Basado en estos resultados, se seleccionaron sacarosa, lisina y arginina como los mejores excipientes para ser investigados adicionalmente para ver su compatibilidad con una cantidad creciente (de 250 µg/ml y 500 µg/ml) de metionina como antioxidante. La composición de las disoluciones analizadas se da en la Tabla 6. Se debe advertir que estas disoluciones han sido preparadas ex novo.

5

Tabla 6. Composición de formulaciones monodosis de r-hLH que contienen los agentes estabilizantes seleccionados y diferentes cantidades de metionina.

Componentes Cantidad/ml	SAC/250	ARG/250	LYS/250	SAC/500	ARG/500	LYS/500
r-hLH a granel	6 µg					
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg					
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg					
Metionina	250 µg	250 µg	250 µg	500 µg	500 µg	500 µg
Tween 20	50 µg					
Sacarosa	105 mg	-	-	105 mg	-	-
Arginina	-	33 mg	-	-	33 mg	-
Lisina	-	-	28 mg	-	-	28 mg
WFI	q.s. hasta 1 ml					

- 5 Se prepararon alrededor de 100 ml de cada disolución, se filtraron a través de una membrana de 22 µm en un holder de acero inoxidable de 22 ml, y se introdujeron en jeringuillas de vidrio de 1 ml para analizar también la compatibilidad entre la sustancia fármaco y el recipiente final (jeringuilla de vidrio de 1 ml + pistón). Las jeringuillas se almacenaron a 2-8°C, +25°C, +33°C y +40°C. La temperatura de almacenamiento de +33°C se introdujo para tener un compromiso entre una cinética de degradación demasiado rápida (+40°C) y demasiado lenta (+25°C). Las disoluciones se analizaron para ver el contenido de r-hLH (por SE-HPLC), formas oxidadas (por RP-HPLC), agregados (por SE-HPLC) y formación de subunidades (cualitativamente por SE-HPLC) hasta 2-3 meses.
- 10

Los resultados del panel completo de análisis aplicado a las formulaciones descritas en la Tabla 6 se dan en las Tablas 7 a 11.

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

Formulación	% de heterodímeros		% de subunidades libres		% de agregados		% de heterodímeros (2-8°C)	
	T=0	T=4d	T=0	T=4d	T=0	T=4d	T=0	T=13w
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

w = semanas

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

Formulación	% de heterodímeros					% de subunidades libres				
	T=0	T=6d	T=4w	T=6w	T=8w	T=0	T=6d	T=4w	T=6w	T=8w
SAC/250	99,12	69,75	65,46	64,82	n.a.	—	29,25	46,04	32,49	n.a.
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

Formulación	% de heterodímeros					% de subunidades libres				
	T=0	T=6d	T=4w	T=6w	T=8w	T=0	T=6d	T=4w	T=6w	T=8w
SAC/500	99,34	71,26	43,14	27,77	n.a.	—	27,12	50,74	52,34	n.a.
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
Formulación	% de agregados									
	T=0	T=6d	T=4w	T=6w	T=8w					
SAC/250	0,89	1,01	n.a.	2,70	n.a.					
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.a.					
ARG/500	1,59	1,83	3,48	2,02	3,86					
LYS/500	1,22	1,09	2,12	1,79	2,85					

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

Formulación	% de heterodímeros			% de subunidades libres			% de agregados		
	T=0	T=4w	T=8w	T=0	T=4w	T=8w	T=0	T=4w	T=8w
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.a.	1,18
SAC/500	99,34	n.a.	61,24	—	n.a.	33,50	0,66	n.a.	5,26
ARG/500	98,41	n.a.	69,45	—	n.a.	27,93	1,59	n.a.	2,63
LYS/500	98,72	n.a.	78,56	—	n.a.	19,81	1,22	n.a.	1,64

Tabla 10. % de formas oxidadas por RP-HPLC

Formulación	4 días (+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

Tabla 11. contenido de r-hLH por SE-HPLC

Formulación	T=0	T=4 días (+40°C)	T=8 semanas (+25°C)	T=4 semanas (+33°C)	T=6 semanas (+33°C)	T=8 semanas (+33°C)
SAC/250	5,03	3,09	5,09	5,31	4,74	n.a.
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.a.	n.a.
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

Basado en estos resultados, la sacarosa mostró una más alta compatibilidad con 250 µg/ml de metionina, la lisina con 500 µg/ml de metionina y la arginina con ambas concentraciones de metionina.

- 5 Ejemplo 2 – Compatibilidad de formulaciones líquidas monodosis de r-hLH con formulación líquida multidosis de FSH.

En vista de los resultados descritos en el Ejemplo 1, las formulaciones descritas en la Tabla 6 se mezclaron con una formulación de FSH (es decir, formulación líquida multidosis de Gonaf®) y se analizaron después de 24 h de

contacto a 25°C según los métodos a continuación:

- RP-HPLC para las formas oxidadas de la subunidad α de r-hLH y r-hFSH (en la Tabla 12 se dan las formas no oxidadas en % de pureza)
 - SE-HPLC para la cuantificación de los agregados.
- 5
- RP-HPLC para la titulación de r-hFSH y r-hLH
 - Bioensayo in vivo de r-hFSH y r-hLH
 - SDS-PAGE para las subunidades libres de r-hFSH y r-hLH y la cuantificación de agregados (datos no dados),
 - Aspecto visual.
- 10 Los resultados se dan en las Tablas 12 a 14.

Tabla 12. Pureza por RP-HPLC y % de agregados por SE-HPLC

Formulación	% 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

Tabla 13. Contenido de FSH y LH

Formulación	contenido de r-hFSH [*]		contenido 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 μ g/ml; ** LH teórico : 100 IU=4 μ g/ml

Tabla 14. Bioensayo

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

Todas las formulaciones monodosis analizadas eran compatibles con la formulación multidosis de Gonal-F® ya que no había:

- . Pérdida de contenido de FSH y LH,
 - . Oxidación,
 - . Agregación y disociación de subunidades libres (por SDS-PAGE)
 - . Pérdida de bioactividad de LH y FSH.
- 15

Ejemplo 3 – Estudio de estabilidad de formulaciones líquidas monodosis.

En base a los resultados de los ejemplos previos, las formulaciones descritas en la Tabla 6, excepto las que

contienen arginina, se prepararon a dos concentraciones diferentes de r-hLH (6 µg/ml y 12 µg/ml), se almacenaron a 2-8°C y +25°C y se analizaron según un riguroso plan de estabilidad y según los siguientes métodos analíticos:

- . RP-HPLC para el contenido de LH
 - . RP-HPLC para las formas oxidadas de la subunidad α
- 5 . SDS-PAGE para los agregados y subunidades libres
- . Bioensayo
 - . pH de la disolución
 - . Aspecto visual.
- 10 Se realizó un análisis estadístico de los resultados de todos los parámetros que se identificaron como indicadores de la estabilidad con la ayuda del software Stabileo 1.1.
- Concentración de r-hLH (por RP-HPLC) al almacenar a 2-8°C y 25±2°C
- No se observó pérdida estadísticamente significativa de concentración de proteína para las formulaciones después de 6 meses de almacenamiento a 2-8°C cualquiera que fuese la concentración de r-hLH (6 µg/ml y 12 µg/ml). Se observó una disminución común de 0,4 µg/mes después de 6 meses de almacenamiento a 25±2°C.
- 15 Bioactividad de r-hLH (bioensayo) al almacenar a 2-8°C y 25±2°C
- No se observó pérdida relevante de actividad para las formulaciones después de 6 meses de almacenamiento a 2-8°C cualquiera que fuese la concentración de r-hLH (6 µg/ml y 12 µg/ml).
- % de subunidades y agregados por SDS-PAGE
- 20 El porcentaje de agregados por SDS-PAGE permanece por debajo del 2% para ambas concentraciones después de 6 meses de almacenamiento a 2-8°C y 25°C. El porcentaje de subunidades por SDS-PAGE permanece por debajo del 2% para ambas concentraciones después de 6 meses de almacenamiento a 2-8°C. Se observó una disminución común de alrededor del 5%/mes después de 6 meses de almacenamiento a 25°C±2°C.
- % de formas oxidadas por RP-HPLC
- 25 Se midió un incremento de alrededor de 0,4%/mes después de 6 meses de almacenamiento a 2-8°C y un incremento en el intervalo 0,6-1,4%/mes a 25°C±2°C.
- pH y aspecto
- No se observó cambio en el aspecto (color, transparencia, partículas visibles) ni en el pH durante la fabricación y en el almacenamiento.
- Ejemplo 4 – Compatibilidad de los agentes estabilizantes y bacteriostáticos para formulaciones multidosis.
- 30 Se analizaron seis agentes estabilizantes (sacarosa, arginina, glicina, lisina, sorbitol y trehalosa) para ver la compatibilidad con agentes bacteriostáticos para suministrar formulaciones multidosis estables. Las formulaciones analizadas se resumen en la Tabla 15.
- Tabla 15. Composición de varias formulaciones multidosis de r-hLH que contienen diferentes combinaciones de agentes estabilizantes y bacteriostáticos.

Componentes Cantidad/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					
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg					
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg					
Metionina	250 µg					
Tween 20	50 µg					
Sacarosa	105 mg	105 mg	105 mg	-	-	-
Arginina	-	-	-	33 mg	33 mg	33 mg
Alcohol bencílico	0.90%	-	-	0.90%	-	-
m-Cresol	-	0.30%	-	-	0.30%	-
Fenol	-	-	0.50%	-	-	0.50%
WFI	q.s. hasta 1 ml					

Componentes Cantidad/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					
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg					
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg					
Metionina	250 µg					
Tween 20	50 µg					
Lisina	28 mg	28 mg	28 mg	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	56.5 mg	56.5 mg	56.5 mg
Alcohol bencílico	0.90%	-	-	0.90%	-	-
m-Cresol	-	0.30%	-	-	0.30%	-
Fenol	-	-	0.50%	-	-	0.50%
WFI	q.s. hasta 1 ml					
Componentes Cantidad/ml	GLY/250/ BA	GLY/250/ mCr	GLY/250/ Phe	TRE/250/ BA	TRE/250/ mCr	TRE/250/ Phe
r-hLH a granel	25 µg					
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1.65 mg					
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.104 mg					
Metionina	250 µg					
Tween 20	50 µg					
Glicina	23 mg	23 mg	23 mg	-	-	-
Trehalosa	-	-	-	106 mg	106 mg	106 mg
Alcohol bencílico	0.90%	-	-	0.90%	-	-
m-Cresol	-	0.30%	-	-	0.30%	-
Fenol	-	-	0.50%	-	-	0.50%
WFI	q.s. hasta 1 ml					

Se prepararon alrededor de 40 ml de cada disolución, se filtraron a través de una membrana de 0,22 µm y se almacenaron a 2-8°C, +25°C y +40°C en tubos de plástico de 15 ml. Las disoluciones se analizaron para ver su contenido de proteína (por HPLC de exclusión de tamaños, SE-HPLC, datos no mostrados), formas oxidadas (por HPLC en fase inversa, RH-HPLC), agregados (por SE-HPLC) y formación de subunidades (cualitativamente por SE-HPLC) hasta 1 mes. Los resultados del panel completo de análisis aplicados a este conjunto de formulaciones se dan en las Tablas 16 a 18. Todas las disoluciones que contenían m-Cresol (mCr) se volvieron opalescentes inmediatamente después de la preparación, debido a una incompatibilidad entre el agente bacteriostático y el tensioactivo (Tween 20).

5
10

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

Formulación	% de heterodímeros			% de subunidades libres			% 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.a.	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.a.	2,05	3,14	n.a.
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

Formulación	% de heterodímeros			% de subunidades libres			% 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.a.	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.a.	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.a.	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.a.	24,28	8,95	14,72	20,83

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

Formulación	% de heterodímeros			% de subunidades libres			% 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

Tabla 18. % de formas oxidadas por RP-HPLC

Formulación	12 días (+40°C)	1 mes (+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
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

5

Basado en estos resultados, se seleccionaron sacarosa, lisina y arginina como los mejores agentes estabilizantes para investigarlos adicionalmente para ver su compatibilidad con una cantidad incrementada de metionina (500 µg/ml). Se seleccionaron alcohol bencílico, fenol y una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio como agentes bacteriostáticos. Las formulaciones analizadas se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19. Composición de varias formulaciones multidosis de r-hLH que contienen los agentes estabilizantes seleccionados y diferentes agentes bacteriostáticos.

Componentes Cantidad/ml	SAC/500 BA	SAC/500 BACL	SAC/500 Phe	ARG/500 BA	ARG/500 BACL	ARG/500 Phe
r-hLH a granel	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
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	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg	500 µg
Tween 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Sacarosa	105 mg	105 mg	105 mg	-	-	-
Arginina	-	-	-	33 mg	33 mg	33 mg
Alcohol bencílico	1.2%	0.30%	-	1.2%	0.30%	-
Cloruro de benzalconio	-	0.001%	-	-	0.001%	-
Fenol	-	-	0.50%	-	-	0.50%
WFI	q.s. hasta 1 ml	q.s. hasta 1 ml	q.s. hasta 1 ml	q.s. hasta 1 ml	q.s. hasta 1 ml	q.s. hasta 1 ml
Componentes: Cantidad/ml	LYS/500/BA		LYS/500/BACL		LYS/500/Phe	
r-hLH a granel	25 µg		25 µg		25 µg	
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	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	
Metionina	500 µg		500 µg		500 µg	
Tween 20	50 µg		50 µg		50 µg	
Lisina	28 mg		28 mg		28 mg	
Alcohol bencílico	1.2%		0.30%		-	
Cloruro de benzalconio	-		0.001%		-	
Fenol	-		-		0.50%	
WFI	q.s. hasta 1 ml		q.s. hasta 1 ml		q.s. hasta 1 ml	

10 Se prepararon alrededor de 100 ml de cada disolución, se filtraron a través de una membrana de 0,22 µm y se introdujeron en cartuchos de 3 ml. Se usó el siguiente envase primario:

- Cartuchos de vidrio de 3 ml (Nuova Ompi) siliconizados
- Tapones de encapsulado, código CAP J 3ML L1H075-1-H1B FM 257/2 (Helvoet Pharma)
- Pistones revestidos: Helvoet V9282 FM257/2 Omniflex revestido.

15

Los cartuchos se almacenaron a 2-8°C, +25°C y +40°C para ser analizados para ver el contenido de proteína (por SE-HPLC), formas oxidadas (por RH-HPLC), agregados (por SE-HPLC) y formación de subunidades (cualitativamente, por SE-HPLC) hasta 2 meses.

Los resultados del panel completo de análisis aplicados a este segundo conjunto de formulaciones se dan en las Tablas 20 a 26.

Tabla 20. Pureza por SE-HPLC (temperatura de almacenamiento: +40°C)

Formulación	% de heterodímeros		% de subunidades libres		% de agregados	
	T=0	T=3 días	T=0	T=3 días	T=0	T=3 días
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
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

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

Formulación	% de heterodímeros				% de subunidades libres			% de agregados	
	T=0	T=3w	T=4w	T=8w	T=0	T=3w	T=4w	T=0	T=3w
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

5

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

Formulación	% de heterodímeros			% de subunidades libres		% de agregados
	T=0	T=4w	T=8w	T=0	T=4w	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

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

Formulación	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

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

Formulación	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

Tabla 25. % de formas oxidadas por RP-HPLC

Formulación	T=0	T=13 semanas (+5°C)	T=0	T=3 días (+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

Tabla 26. Contenido de r-hLH por SE-HPLC

Formulación	T=0	T=3d (+40°C)	T=3w (+33°C)	T=4w (+33°C)	T=8w (+33°C)	T=4w (+25°C)	T=8w (+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

Estos resultados confirmaron la compatibilidad de los agentes estabilizantes con una cantidad incrementada de metionina (véase el Ejemplo 1). Además los resultados mostraron que los agentes bacteriostáticos son compatibles con 500 µg/ml de metionina.

5

Ejemplo 5 – Compatibilidad de formulaciones líquidas multidosis de r-hLH con formulación líquida multidosis de FSH.

Basado en los resultados del Ejemplo 4, se mezclaron formulaciones de r-hLH en cartuchos de 3 ml con una formulación de FSH (es decir, formulación líquida multidosis de Gonal-F®) y se analizaron después de 24 h de contacto a 25°C según los métodos a continuación:

- 10
- SE-HPLC para la pureza,
 - RP-HPLC para la titulación de r-hFSH y r-hLH,
 - RP-HPLC para las formas oxidadas de la subunidad α de r-hLH y r-hFSH,
 - Bioensayo in vivo de r-hFSH y r-hLH.
- 15
- SDS-PAGE para las subunidades libres de r-hLH y r-hFSH y cuantificación de los agregados (no se dan los datos),

- pH de la disolución,
- Aspecto visual.

Los datos se dan en las Tablas 27 a 29.

Tabla 27. Pureza por SE-HPLC

Formulación	% 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

Tabla 28. Contenido de FSH y LH

Formulación	contenido de r-hFSH*		contenido 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 teórica : 200 IU=30,96 µg/ml; [#] LH teórica : 100 IU=8 µg/ml

Tabla 29. Bioensayo

Formulación	actividad de r-hFSH		actividad 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

5

Todas las formulaciones multidosis analizadas son compatibles con la formulación multidosis de Gonal-F® ya que no había:

- pérdida de contenido de FSH y LH,
- oxidación,
- 10 - agregación (por SE-HPLC),
- agregados ni formación de subunidades por SDS-PAGE
- pérdida de bioactividad de LH y FSH.

Ejemplo 6 – Compatibilidad con el envase primario

15 Para analizar la compatibilidad entre las formulaciones de r-hLH y los recipientes finales (jeringuillas y cartuchos), se implementó una matriz de estudio para analizar los siguientes parámetros:

- Efecto de la concentración de r-hLH: 6 µg/ml, 12 µg/ml, 24 µg/ml,

- Efecto del volumen de llenado: 0,25 ml, 0,5 ml, 1 ml,
- Tipo de recipiente: jeringuilla de vidrio de 1 ml y cartucho de vidrio de 3 ml,
- Efecto del agente bacteriostático: formulaciones preparadas con y sin los agentes bacteriostáticos y almacenadas en cartuchos de 3 ml.

5 Se preparó una formulación (SAC/500/BACL) a las diferentes concentraciones de r-hLH y se introdujo en los recipientes con diferentes volúmenes de llenado. Los lotes se compararon cualitativamente por SE-HPLC hasta 1 semana a +33°C. Los resultados se dan en la Figura 1 (A-F). En la Figura 2 (A-B) se compara el porcentaje de heterodímeros por SE-HPLC en la formulación con o sin la combinación de agentes bacteriostáticos.

Mirando los resultados en las Figuras 1 y 2, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- 10
- No hay impacto del recipiente sobre las formulaciones a 12 µg/ml y 24 µg/ml
 - No hay impacto del volumen de llenado sobre las formulaciones a 12 µg/ml y 24 µg/ml
 - Hay un efecto positivo de la concentración incrementada en la disociación de las subunidades
 - No hay diferencia entre lotes con o sin bacteriostáticos
 - La más alta estabilidad está relacionada con la más alta concentración de r-hLH.

15 Ejemplo 7 – Estudio de estabilidad de formulaciones líquidas multidosis

En base a los resultados de los ejemplos previos, se almacenaron cuatro formulaciones descritas en la Tabla 19 (SAC/500/BALC, LYS/500/BA, LYS/500/BALC y ARG/500/Phe) a 2-8°C y +25°C y se analizaron según un riguroso plan de estabilidad y según los siguientes métodos analíticos:

- RP-HPLC para el contenido de LH
- 20 - RP-HPLC para las formas oxidadas de la subunidad α
- RP-HPLC para el contenido de fenol
- RP-HPLC para el contenido de cloruro de benzalconio
- RP-HPLC para el contenido de alcohol bencílico
- SDS-PAGE para los agregados y las subunidades libres
- 25 - Bioensayo
- pH de la disolución
- Aspecto visual.

La cantidad de lisina y arginina en las formulaciones anteriores se ajustó (es decir, monohidrocloreto de L-lisina a 28,5 mg y monohidrocloreto de L-arginina a 31,5 mg) para optimizar la isotonicidad de las formulaciones.

30 Se realizó un análisis estadístico de los resultados de todos los parámetros que se identificaron como indicadores de la estabilidad con la ayuda del software Stabileo 1.1.

Concentración de r-hLH (por RP-HPLC) al almacenar a 2-8°C y 25±2°C

35 No se observó pérdida estadísticamente significativa de concentración de proteína para las formulaciones después de 12 meses de almacenamiento a 2-8°C. Se observó una disminución común de 0,4 µg/mes después de 6 meses de almacenamiento a 25±2°C.

Bioactividad de r-hLH (bioensayo) al almacenar a 2-8°C y 25±2°C

No se observó pérdida relevante de actividad para las formulaciones después de 12 meses de almacenamiento a 2-8°C y 25±2°C.

% de subunidades y agregados por SDS-PAGE

40 El porcentaje de agregados por SDS-PAGE permanece por debajo del 2% para ambas concentraciones después de 12 meses de almacenamiento a 2-8°C y 25°C.

El porcentaje de subunidades por SDS-PAGE se incrementa por encima del 32% después de 6 meses a 25°C para

todas las formulaciones.

% de formas oxidadas por RP-HPLC

SAC/500/BACL Y ARG/500/Phe presentan el menor incremento de formas oxidadas.

pH y aspecto

- 5 No se observó cambio en el aspecto (color, transparencia, partículas visibles) ni en el pH durante la fabricación y en el almacenamiento.

Contenido de agentes bacteriostáticos

- 10 Se detectaron las cantidades objetivo de fenol y alcohol bencílico y no se midieron pérdidas para los puntos de chequeo a 6 meses y a 12 meses. Se midió una cantidad de cloruro de benzalconio por debajo del objetivo (6 µg/ml en lugar de 10 µg/ml) en la formulación de SAC/500/BACL en el punto de chequeo a los 6 meses.

Eficacia de los agentes bacteriostáticos

Los resultados de los análisis de eficacia bacteriostática, realizados a T=0 y repetidos después de 9 meses en las formulaciones se dan en las Tablas 30 a 33.

Tabla 30. Resultados del análisis de eficacia bacteriostática en la formulación multidosis SAC/500/BACL

Microorganismo	Reducción logarítmica vs. T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 días	T=14 días	T=28 días
<i>Staphylococcus aureus</i>	>3	>3	>3	>3	sin reducción
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>3	>3	>3	>3	sin reducción
<i>Escherichia coli</i>	no analizado	n.t.	>3	>3	sin reducción
<i>Candida albicans</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	sin incremento
<i>Aspergillus niger</i>	n.t.	n.t.	1.8	>3	sin incremento

Tabla 31. Resultados del análisis de eficacia bacteriostática en la formulación multidosis LYS/500/BACL

Microorganismo	Reducción logarítmica vs. T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 días	T=14 días	T=28 días
<i>Staphylococcus aureus</i>	>3	>3	>3	>3	sin reducción
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>3	>3	>3	>3	sin reducción
<i>Escherichia coli</i>	no analizado	n.t.	>3	>3	sin reducción
<i>Candida albicans</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	sin incremento
<i>Aspergillus niger</i>	n.t.	n.t.	3.3	>3	sin incremento

Tabla 32. Resultados del análisis de eficacia bacteriostática en la formulación multidosis LYS/500/BA

Microorganismo	Reducción logarítmica vs. T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 días	T=14 días	T=28 días
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.05	>3	>3	>3	sin reducción
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>3	>3	>3	>3	sin reducción
<i>Escherichia coli</i>	no analizado	n.t.	>3	>3	sin reducción
<i>Candida albicans</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	sin incremento

<i>Aspergillus niger</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	sin incremento
--------------------------	------	------	----	----	----------------

Tabla 33. Resultados del análisis de eficacia bacteriostática en la formulación multidosis ARG/500/Phe

Microorganismo	Reducción logarítmica vs. T=0				
	T=6 h	T=24 h	T=7 días	T=14 días	T=28 días
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.73	>3	>3	>3	sin reducción
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>3	>3	>3	>3	sin reducción
<i>Escherichia coli</i>	no analizado	n.t.	>3	>3	sin reducción
<i>Candida albicans</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	sin incremento
<i>Aspergillus niger</i>	n.t.	n.t.	>3	>3	sin incremento

5 Las formulaciones que contienen la combinación de 0,3% de alcohol bencílico + 0,001% de cloruro de benzalconio, y sacarosa o lisina (SAC/500/BACL y LYS/500/BACL) cumplen el criterio A de la Farmacopea Europea incluso si la cantidad de cloruro de benzalconio estaba por debajo del objetivo (6 µg/ml en lugar de 10 µg/ml).

La formulación que contiene 0,5% de fenol (ARG/500/Phe) y la formulación que contiene 1,2% de alcohol bencílico (LYS/500/BA) cumplían el criterio B de la Farmacopea Europea.

Conclusiones

- 5 Todas las formulaciones multidosis mostraron un buen perfil de estabilidad después de 12 meses de almacenamiento a 2-8°C.

Referencias

5 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, 732(1): 351-356

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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 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.

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

EP 0 211 894

EP 0 448 146

EP 0 487 512

45 EP 0 505 500

EP 0 618 808

EP 0 814 841

EP 0 853 945

WO 85/01958

WO 98/58957

5 WO 00/04913

WO 01/58493

WO 2004/087213

WO 2004/105788

WO 2004/112826

10 US 3,119,740

US 5,767,067

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación líquida que contiene hormona luteinizante (LH) o una de sus variantes caracterizada porque dicha formulación comprende un tampón de fosfato y una cantidad estabilizante de arginina o sus sales a una concentración de 10 a 50 mg/ml y/o lisina o sus sales a una concentración de 10 a 50 mg/ml.
2. La formulación según la reivindicación 1, en la que la hormona luteinizante (LH) es una hormona luteinizante humana (hLH).
3. La formulación según la reivindicación 1 o 2, en la que la hormona luteinizante (LH) es hormona luteinizante humana recombinante (r-hLH).
- 10 4. La formulación según la reivindicación 1 o 2, en la que la hormona luteinizante (LH) es hormona luteinizante humana urinaria (u-hLH).
5. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la hormona luteinizante (LH) está presente a una concentración de o de alrededor de 1 a o alrededor de 50 µg/ml.
- 15 6. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el tampón de fosfato está presente en una concentración de 1 a 100 mM.
7. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el tampón de fosfato es preferentemente tampón de fosfato de sodio.
8. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un tensioactivo.
- 20 9. La formulación según la reivindicación 8, en la que el tensioactivo es polisorbato 20.
10. La formulación según la reivindicación 9, en la que el polisorbato 20 está presente en una concentración de 0,01 a 10 mg/ml.
11. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente metionina.
- 25 12. La formulación según la reivindicación 11, en la que la metionina está presente en una concentración de 0,01 a 5,0 mg/ml.
13. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un agente bacteriostático.
- 30 14. La formulación según la reivindicación 13, en la que el agente bacteriostático se selecciona de cualquiera de alcohol bencílico, fenol y una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio.
15. La formulación según la reivindicación 13 o 14, en la que el agente bacteriostático está presente en una concentración de 0,005 a 15 mg/ml.
16. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente agua para inyección.
- 35 17. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene un pH en el intervalo de 7,5 a 8,5.
18. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende por lo menos 25 µg/ml de r-hLH, 1,65 mg/ml de Na₂HPO₄ 2H₂O, 0,104 mg/ml de NaH₂PO₄ H₂O, 31,5 mg/ml de monohidrocloreto de L-arginina, 0,05 mg/ml de Tween 20, 0,5 mg/ml de metionina y 5 mg/ml de fenol.
- 40 19. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 17, que comprende por lo menos 25 µg/ml de r-hLH, 1,65 mg/ml de Na₂HPO₄ 2H₂O, 0,104 mg/ml de NaH₂PO₄ H₂O, 28,5 mg/ml de monohidrocloreto de lisina, 0,05 mg/ml de Tween 20, 0,5 mg/ml de metionina y 12 mg/ml de alcohol bencílico.
- 45 20. Las formulaciones según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprenden por lo menos 25 µg/ml de r-hLH, 1,65 mg/ml de Na₂HPO₄ 2H₂O, 0,104 mg/ml de NaH₂PO₄ H₂O, 28,5 mg/ml de monohidrocloreto de lisina, 0,05 mg/ml de Tween 20, 0,5 mg/ml de metionina, 3 mg/ml de alcohol bencílico y 0,01 mg/ml de cloruro de benzalconio.
21. Una composición farmacéutica que comprende la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

22. Una forma de presentación de la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, herméticamente sellada en condiciones estériles en un recipiente apropiado para almacenamiento previamente a su uso.
- 5 23. El procedimiento para la preparación de la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, que comprende la dilución de la hormona luteinizante (LH) con una disolución de excipientes.
24. El uso de la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para la preparación de un medicamento.
25. El uso de la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la infertilidad en mujeres y/o hombres.
- 10 26. El uso de la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en combinación con una formulación líquida que comprende hormona estimulante del folículo (FSH) o una de sus variantes.
27. La formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para el tratamiento de la infertilidad en mujeres y/o hombres.

Figura 1

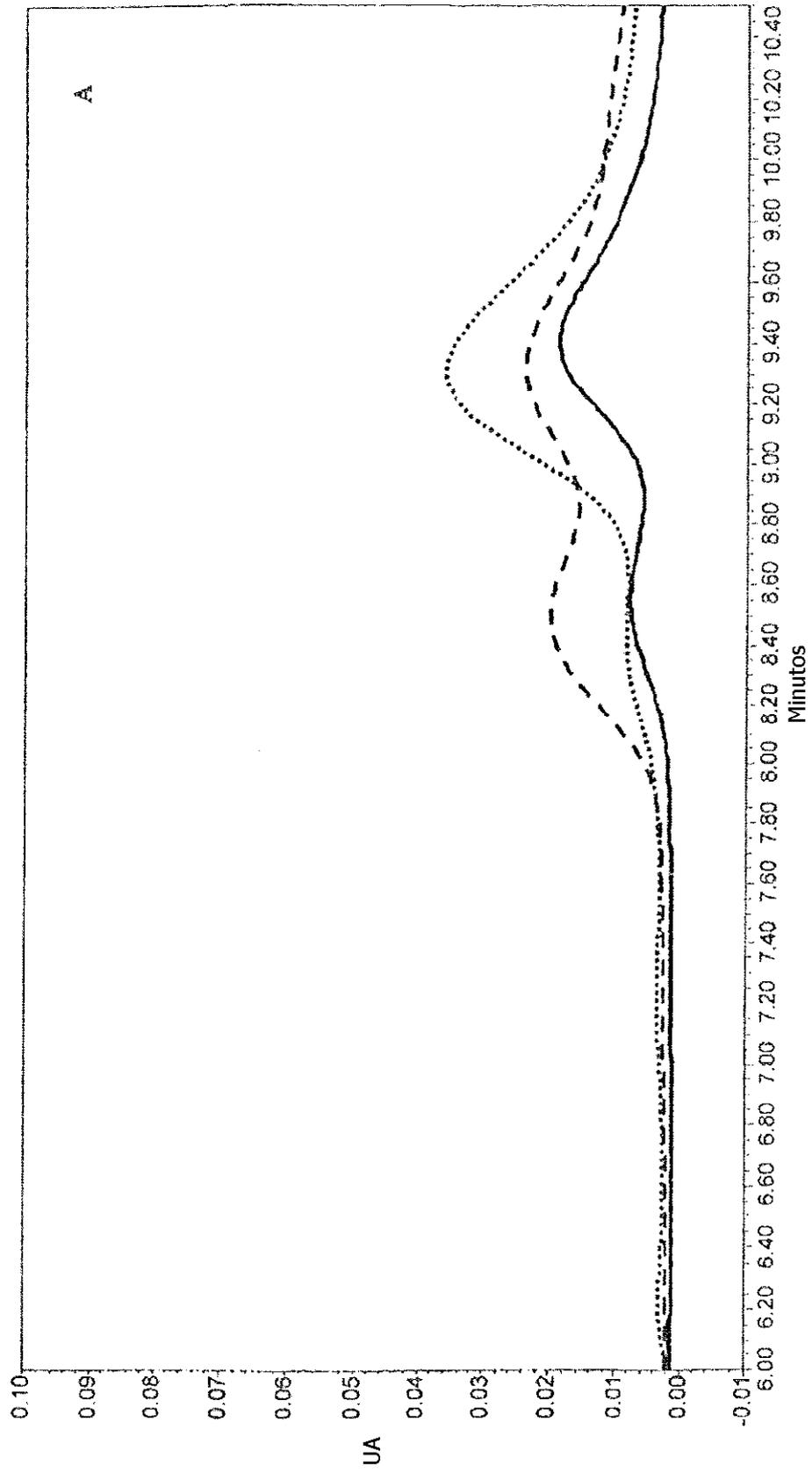


Figura 1 - Continuación

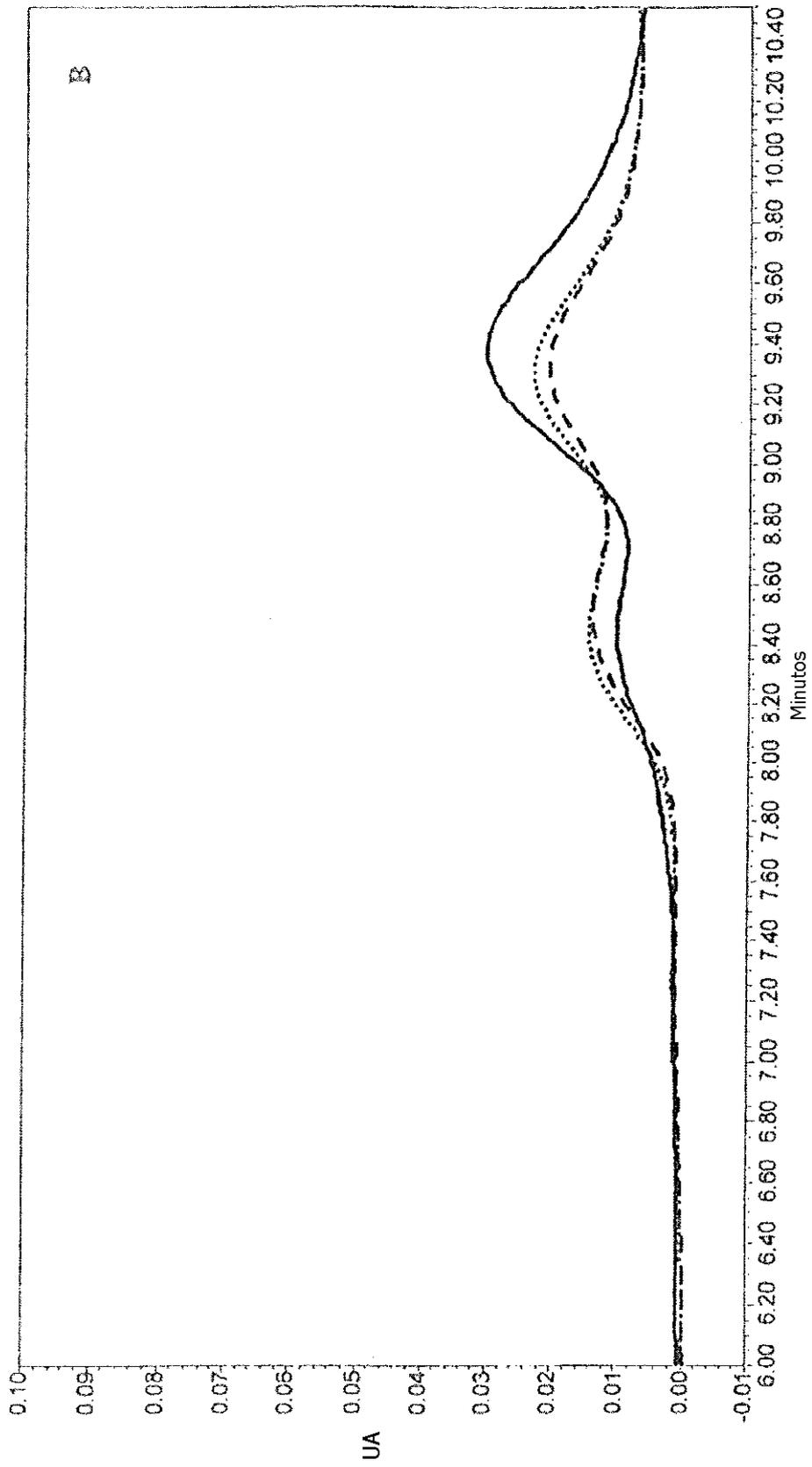


Figura 1 - Continuación

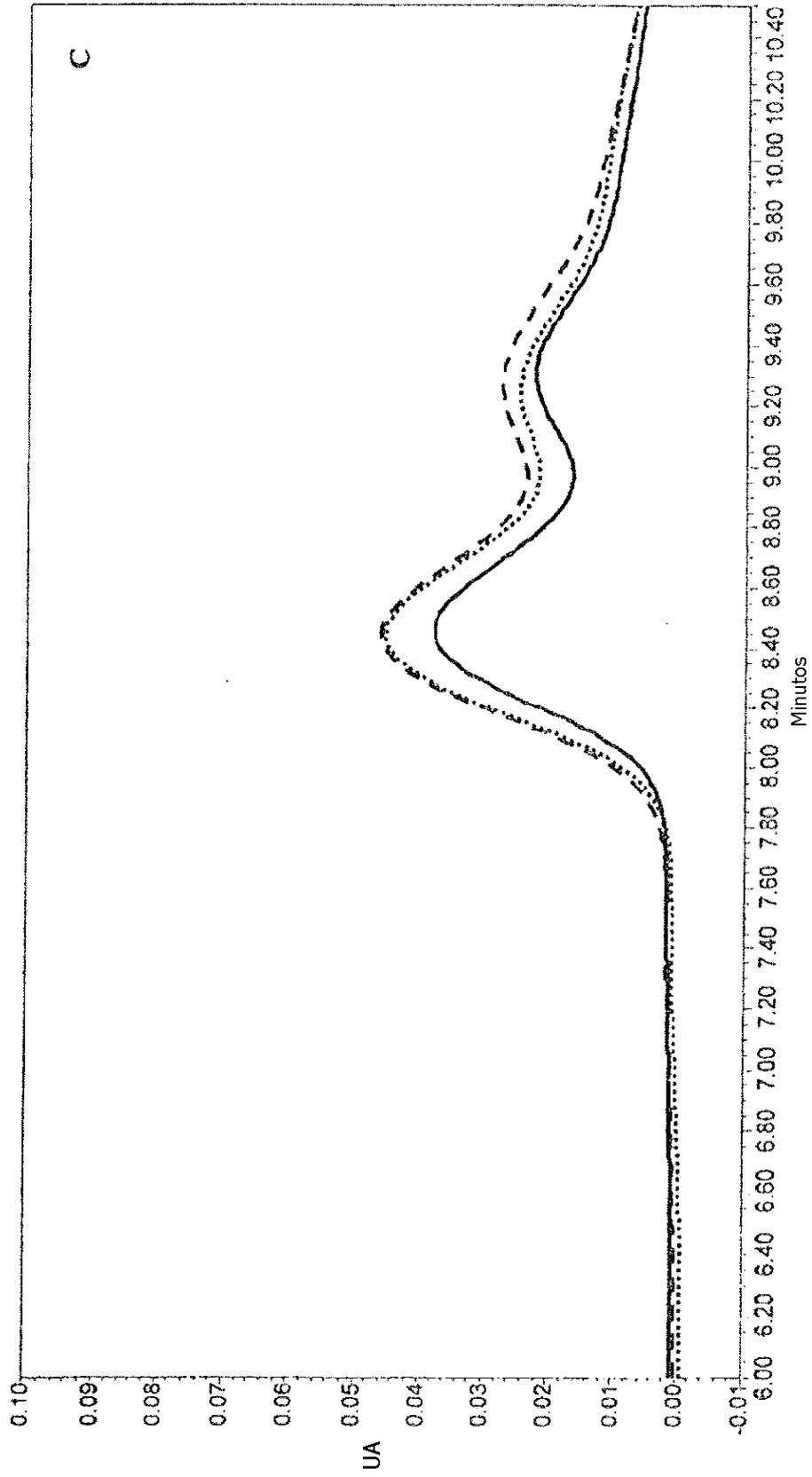


Figura 1 - Continuación

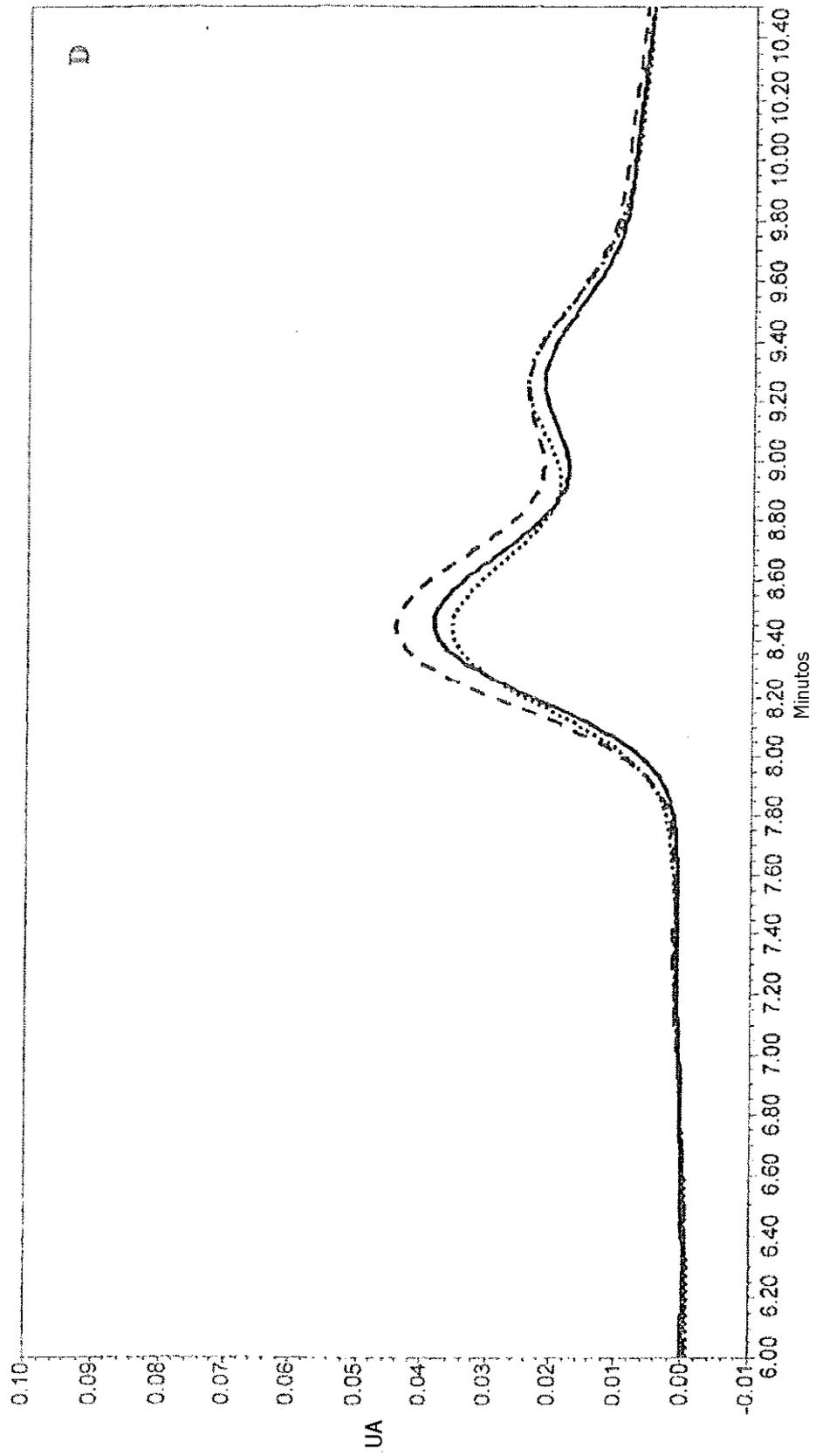


Figura 1 - Continuación

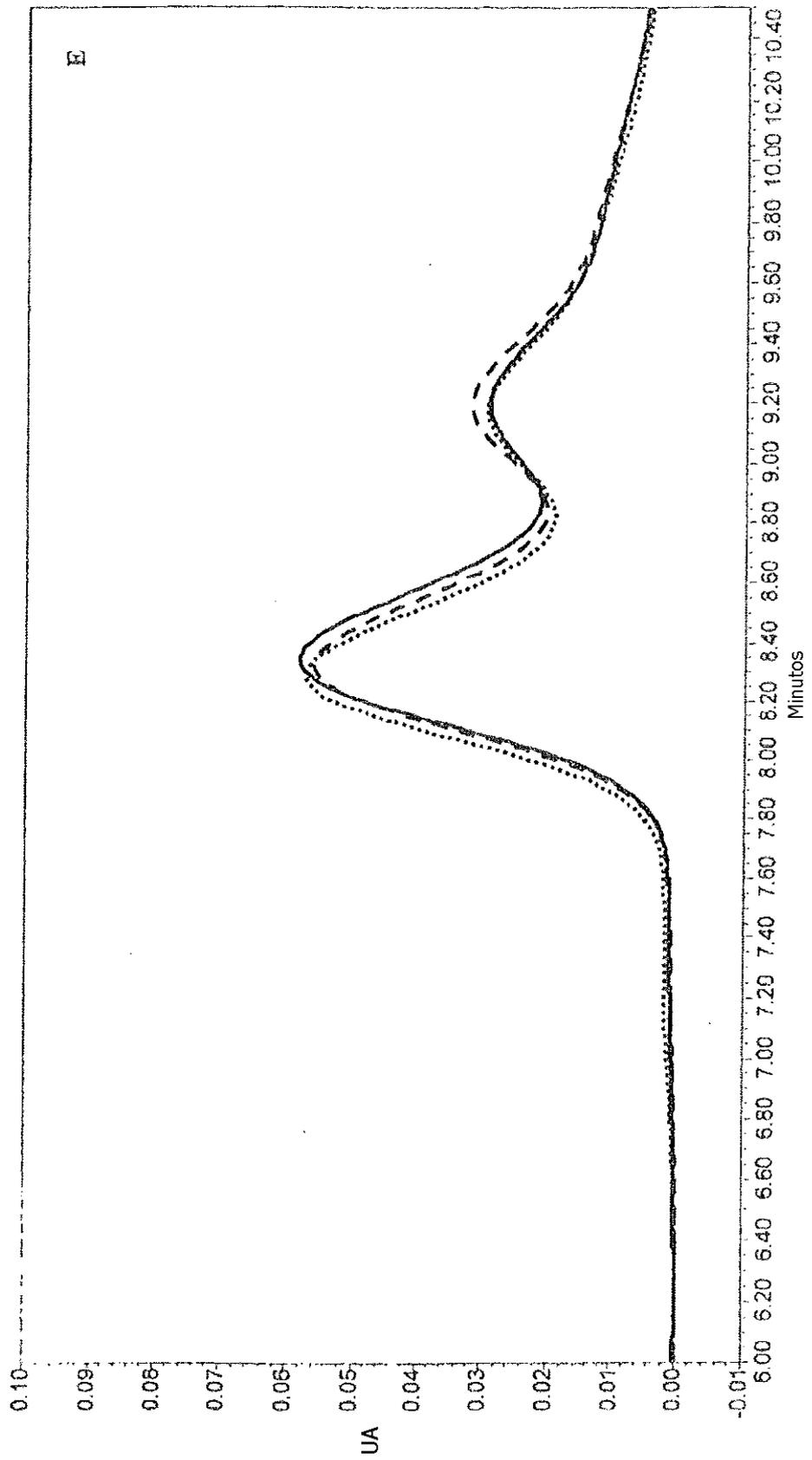


Figura 1 - Continuación

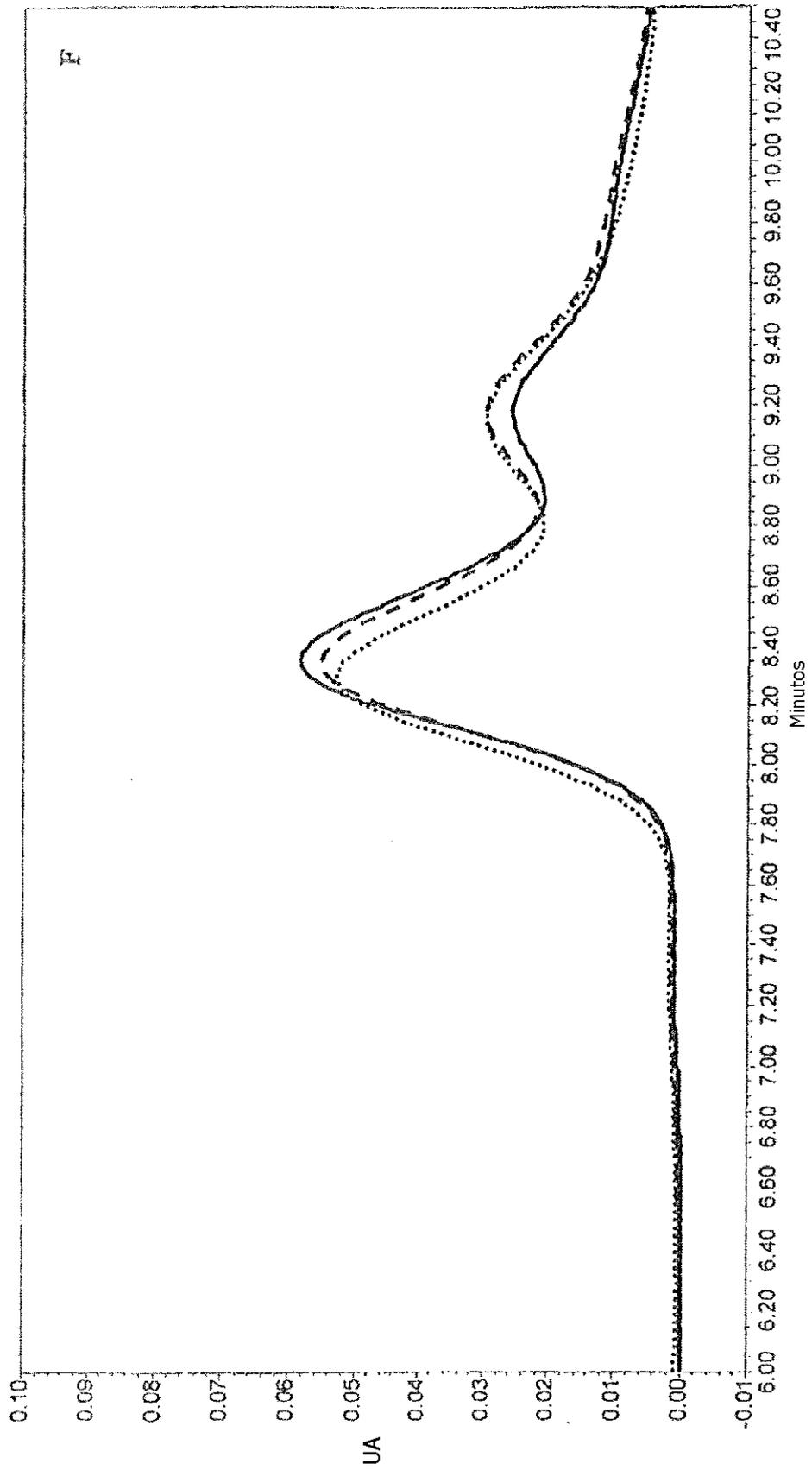


Figura 2

