

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 705**

51 Int. Cl.:

A61K 38/24 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2004** **E 04766052 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013** **EP 1638595**

54 Título: **Formulaciones liofilizadas de FSH/LH**

30 Prioridad:

20.06.2003 EP 03101830

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.07.2013

73 Titular/es:

**ARES TRADING S.A. (100.0%)
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ
1170 AUBONNE, CH**

72 Inventor/es:

**SAMARITANI, FABRIZIO y
DONATI, PIERGIORGIO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 414 705 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 liofilizadas de FSH/LH

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de las formulaciones liofilizadas de la hormona estimulante de los folículos (FSH), la hormona luteinizante (LH), y mezclas de la FSH y la hormona luteinizante (LH), y a métodos para producir dichas formulaciones.

Fundamento de la invención

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

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

15 La FSH se usa en pacientes hembras en inducción de la ovulación (IO) y en la hiperestimulación ovárica controlada (HEC) para tecnologías de reproducción asistida (TRA). En un régimen de tratamiento típico para inducción de la ovulación, se administran a un paciente diariamente inyecciones de FSH o una de sus variantes (aproximadamente 75 a 300 UI de FSH/día) durante un periodo de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 días. En un régimen de tratamiento típico para hiperestimulación ovárica controlada, se administran a un paciente diariamente inyecciones de FSH o una de sus variantes (aproximadamente 150-600 UI de FSH/día) durante un periodo aproximadamente 6 a
20 aproximadamente 12 días.

La FSH se usa también para inducir la espermatogénesis en hombres que padecen oligospermia. Un régimen que usa 150 UI de FSH 3 veces a la semana en combinación con 2500 UI de hCG dos veces a la semana ha tenido éxito en conseguir una mejora en el recuento de espermatozoides en hombres que padecen hipogonadismo hipogonadotrófico¹.

25 La LH se usa en pacientes hembras en combinación con la FSH en la IO y en la HEC, particularmente en los pacientes que tienen muy bajos niveles de LH endógeno o resistencia a la LH, tales como las mujeres que padecen hipogonadismo hipogonadotrófico (HH, grupo I de la WHO) o pacientes mayores (es decir, de 35 años o más), y pacientes en los cuales es un problema la implantación de embriones o un aborto prematuro. La LH en combinación con la FSH ha estado tradicionalmente disponible en una preparación denominada gonadotropinas menopáusicas humanas (hMG) extraída de la orina de mujeres posmenopáusicas. La hMG tiene una relación 1:1 de actividad FSH:LH.

30 La CG actúa en el mismo receptor que la LH y desencadena las mismas respuestas. La CG tiene en circulación una semivida más larga que la LH y por tanto se usa más comúnmente como fuente de acción a largo plazo de actividad de LH. La CG se usa en regímenes de IO y HEC para mimetizar el pico de la LH natural y desencadenar la ovulación. Una inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) se usa para desencadenar la ovulación en el final de la estimulación con FSH o una mezcla de FSH y LH. La CG también se puede usar junto con FSH durante la estimulación para IO y HEC, con el fin de proporcionar actividad de LH durante la estimulación en pacientes en los cuales es deseable actividad de LH, tal como los antes mencionados.
35

Las FSH, LH y CG son miembros de la familia de hormonas glicoproteínicas heterodímeras, que incluye también la hormona estimulante del tiroides (TSH). Los miembros de esta familia son heterodímeros, que comprenden una subunidad α y β . Las subunidades se mantienen juntas por interacciones no covalentes. El heterodímero FSH (hFSH) humano consiste en (i) una subunidad alfa de la glicoproteína madura de 92 aminoácidos, que también es común a otros miembros de la familia humana (es decir, la gonadotropina coriónica ("CG"), la hormona luteinizante ("LH") y la hormona estimulante del tiroides ("TSH"); y (ii) una subunidad beta madura de 111 aminoácidos que es única de FSH². El heterodímero de LH humano consiste en: (i) la subunidad alfa de la glicoproteína madura de 92 aminoácidos; y (ii) una subunidad beta madura de 112 aminoácidos que es única para LH³. Las subunidades alfa y
45 beta de las glicoproteínas pueden ser propensas a disociarse en formulaciones, debido a la interacción con un conservante, tensioactivo y otros excipientes. La disociación de las subunidades conduce a pérdida de actividad biológica⁴.

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 UI/vial y 150 UI/vial con una semivida de uno y medio a dos años cuando se
50 conserva a 2-25°C. Una solución para inyección se forma reconstituyendo el producto liofilizado con agua para inyección (API). Para la inducción de la ovulación o la hiperestimulación ovárica controlada, se recomiendan inyecciones diarias partiendo de dosis de 75 UI a 600 UI durante hasta aproximadamente diez días. Dependiendo de la respuesta del paciente, se pueden usar hasta tres ciclos de tratamiento con dosis crecientes de FSH. Con formulaciones liofilizadas, se requiere que el paciente reconstituya un nuevo vial de material liofilizado con diluyente y lo administre inmediatamente después de reconstitución de un modo diario [Prospecto del envase N1700101A, publicado
55 en febrero de 1996, para FertinexTM (urofollitropina para inyección, purificada) para inyección subcutánea, por Sero-no Laboratories, Inc., Randolph, MA].

La FSH también ha sido formulada tanto en formatos líquidos de unidosis como de multidosis, en viales o ampollas.

Los formatos de unidosos deben permanecer estables y potentes en conservación antes de su uso. Los formatos multidosis no solamente deben ser estables y potentes en conservación antes de su uso, sino que también deben permanecer estables, potentes y relativamente exentos de bacterias en todo el periodo de administración del régimen de uso de múltiples dosis, después de que ha sido quitado el precinto o cierre hermético de la ampolla. Por esta razón los formatos multidosis contienen 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 UI/vial con una semivida de un año y medio a dos años cuando se conserva a 2-25°C. Se forma una solución para inyección reconstituyendo el producto liofilizado con agua para inyección (API). Para la inducción de la ovulación o la hiperestimulación ovárica controlada, junto con la FSH, se recomiendan inyecciones diarias partiendo de dosis de 75 UI a 600 UI de LH durante hasta aproximadamente diez días.

La patente de EE.UU. 5.384.132 describe preparaciones que contienen gonadotropina liofilizada que contienen FSH y LH y un estabilizador constituido por sal de ácido dicarboxílico, tal como citrato, y que opcionalmente contiene sacarosa y tensioactivos. La presencia de una sal de ácido dicarboxílico es obligatoria de acuerdo con este documento para conseguir estabilidad.

La patente europea EP 0618808 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.) describe una composición farmacéutica que comprende una mezcla íntima sólida de gonadotropina y una cantidad estabilizante de sacarosa sola o en combinación con glicina.

La patente europea EP 0814841 (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.

La patente europea EP 0448146 (AKZO N.V.) describe una gonadotropina estabilizada que contiene liofilizado que comprende una parte en peso de una gonadotropina; y 200 a 10.000 partes en peso de un estabilizador a base de sal de ácido dicarboxílico asociado con la gonadotropina.

La patente europea EP 0853945 (Akzo Nobel N.V.) describe una formulación que contiene gonadotropina líquida que contiene FSH y LH 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. Como en la patente de EE.UU. 5.384.132 la presencia de una sal de ácido dicarboxílico es obligatoria para conseguir una formulación estable.

El documento de patente WO 00/04913 (Eli Lilly y 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, alquil-parabeno (metil-, etil-, propil-, butil- y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal o sus mezclas en un diluyente acuoso.

Sumario de la invención

Es un objeto de la invención proporcionar nuevas formulaciones liofilizadas de mezclas de FSH y LH, para proporcionar métodos para su preparación, y métodos para su uso farmacéutico o veterinario en el tratamiento de trastornos de fertilidad.

En un primer aspecto, la invención proporciona una formulación liofilizada que consiste en FSH o una de sus variantes, así como LH o una de sus variantes, un tensioactivo seleccionado de Tween 20 (monolaurato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 80 (monooleato de polioxietileno(20)-sorbitano), un antioxidante que es metionina, un tampón de fosfato y un estabilizador y agente de ajuste de la tonicidad seleccionado del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y azúcar-alcoholes.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para fabricar una formulación liofilizada que comprende formar una mezcla que consiste en FSH o una de sus variantes y LH o una de sus variantes, un tensioactivo seleccionado de Tween 20 (monolaurato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 80 (monooleato de polioxietileno(20)-sorbitano), un antioxidante que es metionina, un tampón de fosfato y un estabilizador y agente de ajuste de la tonicidad seleccionado del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y azúcar-alcoholes y someter la mezcla a liofilización.

En un tercer aspecto la invención proporciona un artículo de manufactura para uso farmacéutico humano, que comprende un primer envase relleno con una formulación liofilizada que consiste en FSH o una de sus variantes o LH o una de sus variantes, un tensioactivo seleccionado de Tween 20 (monolaurato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 80 (monooleato de polioxietileno(20)-sorbitano), un antioxidante que es metionina, un tampón de fosfato y un estabilizador y agente de ajuste de la tonicidad seleccionado del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y azúcar-alcoholes, y un segundo envase que comprende un disolvente para reconstitución.

Descripción detallada de la invención

Las formulaciones mixtas de FSH/LH de la presente invención tienen propiedades mejoradas o más adecuadas o estabilidad, y son útiles para el tratamiento de la infertilidad en mujeres y/o hombres. Estas formulaciones y artículos de manufactura son adecuados adicionalmente para uso en sistemas inyectables y de administración alternativa, por

ejemplo, pero sin limitación, de liberación prolongada nasal, pulmonar, transmucosal, transdérmica, oral, subcutánea, intramuscular o parenteral. En una realización particularmente preferida las formulaciones de la invención son para inyección subcutánea y/o intramuscular. Las formulaciones de FSH, LH o variantes de FSH y LH proporcionadas pueden también tener aumentada la potencia *in vivo* en el tiempo comparadas con productos comerciales conocidos, impidiendo o reduciendo la pérdida de actividad o estabilidad, o mejorando cualquier aspecto de la eficacia o deseabilidad de administración, por ejemplo, en al menos uno de modo, frecuencia, dosificación, comodidad, facilidad de uso, actividad biológica *in vitro* o *in vivo* y similares.

La hormona estimulante de los folículos, o FSH, tal como se usa en la presente invención se refiere a la FSH producida como proteína madura de longitud completa que incluye, pero sin limitación: la FSH humana o "hFSH", tanto si es producida recombinantemente o aislada de fuentes humanas, tales como la orina de mujeres posmenopáusicas. La secuencia de la proteína de la subunidad alfa de la glicoproteína es proporcionada en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de la proteína de la subunidad beta de la FSH humana se da en la SEQ ID NO:2.

La expresión "variante de FSH" se emplea para abarcar las moléculas que difieren en la secuencia de aminoácidos, modelo de glicosilación o enlace inter-subunidades de la FSH humana pero que exhiben actividad de FSH. Ejemplos incluyen CTP-FSH, una FSH recombinante modificada de acción a largo plazo, que consiste en una subunidad α de tipo natural y una subunidad β híbrida en la cual el péptido carboxi terminal de hCG ha sido fusionado al C-terminal de la subunidad β de FSH, como se describe en el trabajo de LaPolt et al.; *Endocrinology*, 1992, 131, 2514-2520; o Klein et al.; *Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist*; *Human Reprod.* 2003, 18, 50-56]. También está incluida una sola cadena de CTP-FSH, una molécula monocatenaria, que consiste en las secuencias siguientes (desde el N-terminal al C-terminal):

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

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

Las variantes de FSH a las que se hace referencia en la presente memoria incluyen también las deleciones carboxi terminales de la subunidad beta que son más cortas que la proteína madura de longitud completa de SEQ ID NO:2. Las deleciones carboxi terminales de la subunidad beta humana se facilitan en las SEQ IDS NOS: 3, 4, y 5. Ha de entenderse que las variantes carboxi terminales de la cadena beta forman dímeros con una subunidad alfa conocida para formar un heterodímero variante de FSH.

Se pueden producir heterodímeros de FSH o heterodímeros de variantes FSH por cualquier método adecuado, tal como recombinantemente, por aislamiento o purificación de fuentes naturales como puede ser el caso o por síntesis química o cualquiera de sus combinaciones.

El uso del término "recombinante" se refiere a preparaciones de variantes de FSH, LH o FSH y LH que se producen a través del uso de tecnología de DNA recombinante (véase por ejemplo WO 85/01958). Las secuencias para los clones genómicos y de cDNA de FSH son conocidas para las subunidades alfa y beta de diversas especies⁶. Un ejemplo de un método de expresar FSH o LH usando tecnología recombinante es por transfección de células eucarióticas con las secuencias de DNA que codifican una subunidad alfa y beta de FSH o LH, ya sea proporcionadas en un vector o en dos vectores, teniendo cada subunidad un promotor separado, como se describe en las patentes europeas nº EP 0211894 y EP 0487512. Otro ejemplo del uso de tecnología recombinante para producir FSH o LH es mediante el empleo de recombinación homóloga para insertar un segmento regulador heterólogo en conexión operativa con las secuencias endógenas que codifican las subunidades de FSH o LH, como se describe en la patente europea nº EP 0505500 (de Applied Research Systems ARS Holding NV).

La variante de FSH o FSH usada de acuerdo con la presente invención puede ser producida no solamente por medios recombinantes, incluyendo partir de células de mamíferos, sino que también pueden ser purificadas a partir de otras fuentes biológicas, tal como a partir de fuentes urinarias. Las metodologías aceptables incluyen las descritas en Hakola, K. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 127:59-69, 1997; Keene, et al., *J. Biol. Chem.*, 264:4769-4775, 1989; Cerpa-Poljak, et al., *Endocrinology*, 132:351-356, 1993; Dias, et al., *J. Biol. Chem.*, 269:25289-25294, 1994; Flack, et al., *J. Biol. Chem.*, 269:14015-14020, 1994; y Valove, et al., *Endocrinology*, 135:2657-2661, 1994, la patente de EE.UU. 3.119.740 y la patente de EE.UU. 5.767.067.

La hormona luteinizante, o LH, como se usa en la presente memoria se refiere a la LH producida como una proteína madura de longitud completa, que incluye, pero sin limitación: LH humana o "hLH", ya sea producida recombinantemente o aislada de fuentes humanas, tales como orina de mujeres posmenopáusicas. La secuencia de proteína de la subunidad alfa de la glicoproteína humana se proporciona en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de proteína de la subunidad beta⁷ de la LH humana se facilita en la SEQ ID NO: 6. En una realización preferida la LH es recombinante.

La expresión "variante de LH" se emplea para abarcar las moléculas que difieren en secuencia de aminoácidos, modelo de glicosilación o enlace inter-subunidades de la LH humana pero que exhiben actividad de LH.

Los heterodímeros de LH o los heterodímeros variantes de LH pueden ser producidos por cualquier método adecuado, tal como recombinantemente, por aislamiento o purificación a partir de fuentes naturales como puede ser el caso, o por síntesis química, o cualquiera de sus combinaciones.

El término "administrar" o "administración" significa 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" significa un mamífero que se es tratado para una enfermedad o estado. Los pacientes, sin limitación, son del siguiente origen: humano, ovino, porcino, equino, bovino, conejos y similares.

El término "potencia" en relación con la actividad de FSH, se refiere a la capacidad de una formulación o formulación mixta de FSH de desencadenar respuestas biológicas asociadas con la FSH, tales como ganancia de peso ovárico en el ensayo de Steelman-Pohley⁸, o crecimiento folicular en una paciente hembra. El crecimiento folicular en una paciente hembra puede ser evaluado por ultrasonidos, por ejemplo, en términos del número de folículos que tienen un diámetro medio de 16 mm o aproximadamente 16 mm el día 8 de la estimulación. La actividad biológica se evalúa con respecto a un patrón aceptado para la FSH.

El término "potencia" en relación con la actividad de la LH, se refiere a la capacidad de una formulación o formulación mixta de LH de desencadenar respuestas biológicas asociadas a la LH, tales como un método de ensayo de ganancia de peso de la vesícula seminal⁹. La actividad biológica de LH se evalúa con respecto a un patrón aceptado para LH.

El término "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 más disolventes miscibles, y pueden contener solutos disueltos, tales como azúcares, tampones, sales u otros excipientes. Los disolventes no acuosos más comúnmente usados son 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 ajuste de la isotonicidad" es un compuesto que es tolerado fisiológicamente e imparte una tonicidad adecuada a una formulación para impedir el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación. Habitualmente se usan para dichos fines compuestos tales como glicerina en concentraciones conocidas. Otros agentes de isotonicidad adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos o proteínas (por ejemplo, glicina o albúmina), sales (por ejemplo, cloruro de sodio), y azúcares (por ejemplo, dextrosa, sacarosa y lactosa).

El término "tampón" o "tampón fisiológicamente aceptable" se refiere a soluciones de compuestos que se sabe que son seguros para uso farmacéutico o veterinario en formulaciones y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación en el intervalo de pH deseado para la formulación. Los tampones aceptables para controlar el pH a un valor de pH de moderadamente ácido a moderadamente básico pH incluyen, pero sin limitación, compuestos tales como fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina. "TRIS" se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol, y a cualquiera de sus sales farmacológicamente aceptables. Los tampones preferibles son tampones de fosfato con solución salina o una sal aceptable.

El término "tampón de fosfato" se refiere a soluciones 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, incluyendo pero sin limitación, sales de sodio y potasio. Se conocen en la técnica diversas sales de ácido fosfórico, tales como sales monobásicas, dibásicas y tribásicas del ácido. Se sabe que las sales del ácido fosfórico también se presentan como hidratos de la sal. Los tampones de fosfato pueden cubrir un intervalo de valores de pH, tal como desde pH aproximadamente 4 hasta pH aproximadamente 10, y los intervalos preferidos de pH aproximadamente 5 a pH aproximadamente 9, y un intervalo más preferido de 6,0 o aproximadamente 6,0 hasta 8,0 o aproximadamente 8,0, más preferiblemente pH 7,0 o aproximadamente pH 7,0.

El término "vial" o "envase" se refiere ampliamente a un reservorio adecuado para retener FSH en forma sólida o líquida en un estado contenido estéril. Ejemplos de un vial como se usa en la presente descripción incluyen ampollas, cartuchos, envases blíster u otros de dichos reservorios adecuados para el suministro de la FSH al paciente mediante una jeringa, bomba (incluyendo osmótica), catéter, parche transdérmico, pulverización pulmonar o transmucosal. Los viales adecuados para envasar productos para administración parenteral, pulmonar, transmucosal o transdérmica son bien conocidos y reconocidos en la técnica.

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

Una solución o formulación "estable" es una en donde el grado de degradación, modificación, agregación, pérdida de

actividad biológica y similares, de sus proteínas está controlado aceptablemente, y no aumenta inaceptablemente con el tiempo. Preferiblemente la formulación retiene al menos 80% o aproximadamente 80% de la actividad de la FSH etiquetada durante un periodo de 6 meses a una temperatura de aproximadamente 2-8°C, más preferiblemente de aproximadamente 2-8°C, más preferiblemente de aproximadamente 4-5°C. La actividad de FSH se puede medir usando el biosensayo de ganancia de peso ovárico de Steelman-Pohle⁵. La actividad de LH se puede medir usando el biosensayo de ganancia de peso de la vesícula seminal¹⁰.

El término "tratamiento" se refiere a la administración, seguimiento, gestión y/o cuidado de un paciente para el cual es deseable la administración de la FSH y/o la LH con el fin de estimulación folicular o testicular o cualquier otra respuesta fisiológica regulada por la FSH y/o la LH. El tratamiento puede por tanto incluir, pero sin limitación, la administración de FSH y/o LH para la inducción o mejora de la calidad del esperma, estimulación de la liberación de testosterona en machos o desarrollo folicular o inducción de la ovulación en hembras.

Una "sal" de la proteína es una sal de adición de ácido o base. Dichas sales se forman preferiblemente entre uno cualquiera o más de los grupos cargados de la proteína y uno cualquiera o más cationes o aniones no tóxicos fisiológicamente aceptables. Las sales orgánicas e inorgánicas incluyen, por ejemplo, las preparadas a partir de ácidos, tales como 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, sales de amonio, sodio, potasio, calcio, o magnesio.

Los inventores han encontrado que un tensioactivo seleccionado del grupo de polisorbatos, en particular Tween 20 (monolaurato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 80 (monooleato de polioxietileno(20)-sorbitano) es un excipiente adecuado para preparar una formulación estable que comprende una mezcla de LH y FSH. El tensioactivo preferido es Tween 20. Los polisorbatos son tensioactivos que están disponibles en el comercio (por ejemplo de Merck).

El tensioactivo, por ejemplo Tween 20, está presente preferiblemente en la formulación liofilizada a una concentración de 0,001 o aproximadamente 0,001 a 0,1 o aproximadamente 0,1 mg por mg de la formulación total, más preferiblemente a 0,01 o aproximadamente 0,01 a 0,075 o aproximadamente 0,075 mg/mg.

Preferiblemente la concentración de Tween, particularmente Tween 20, en las formulaciones reconstituidas es 0,01 o aproximadamente 0,01 mg/ml a 1 o aproximadamente 1 mg/ml, más preferiblemente 0,05 o aproximadamente 0,05 mg/ml a 0,5 o aproximadamente 0,5 mg/ml, más particularmente preferiblemente 0,2 o aproximadamente 0,2 mg/ml a 0,4 o aproximadamente 0,4 mg/ml, más preferiblemente 0,1 o aproximadamente 0,1 mg/ml.

La hormona estimulante de los folículos (FSH) dentro la formulación liofilizada está preferiblemente presente a una concentración (p/p) de 0,1 a 10 o aproximadamente 0,1 a 10 µg/mg de la formulación total. En una realización, la hormona estimulante de los folículos (FSH) está presente a una concentración 0,3 a 5 o aproximadamente 0,3 a 5 µg/mg de la formulación total. En una realización adicional la hormona estimulante de los folículos (FSH) está presente a una concentración de 0,37 a 2 o aproximadamente 0,37 a 2 µg/mg de formulación total.

La hormona luteinizante (LH) dentro de la formulación liofilizada está preferiblemente presente a una concentración de 0,1 a 3 o aproximadamente 0,1 a 3 µg/mg de la formulación total. En una realización, la hormona luteinizante (LH) está presente a una concentración de 0,1 a 1 o aproximadamente 0,1 a 1 µg/mg de la formulación total. En una realización adicional, la hormona luteinizante (LH) está presente a una concentración de 0,1 a 0,6 o aproximadamente 0,1 a 0,6 µg/mg de la formulación total.

En las formulaciones reconstituidas, la concentración de FSH en la formulación preferiblemente es 150 o aproximadamente 150 UI/ml a 2.000 o aproximadamente 2.000 UI/ml, más preferiblemente 300 o aproximadamente 300 UI/ml a 1.500 o aproximadamente 1.500 UI/ml, más particularmente preferiblemente 450 o aproximadamente 450 a 750 o aproximadamente 750, más preferiblemente 600 o aproximadamente 600 UI/ml.

En las formulaciones reconstituidas, la concentración de LH en la formulación es preferiblemente 50 o aproximadamente 50 UI/ml a 2.000 a aproximadamente 2.000 UI/ml, más preferiblemente 150 o aproximadamente 150 a 1.500 o aproximadamente 1.500 UI/ml, más particularmente preferiblemente 300 o aproximadamente 300 UI/ml a 750 o aproximadamente 750 UI/ml, particularmente preferiblemente 625 UI/ml.

La relación de FSH a LH (FSH:LH, UI:UI, FSH medida con el ensayo de ganancia de peso ovárico en ratas y la LH medida con el ensayo de peso de la vesícula seminal en ratas) está preferiblemente dentro del intervalo de 6:1 a aproximadamente 6:1 a 1:6 o aproximadamente 1:6, más preferiblemente 4:1 o aproximadamente 4:1 a 1:2 o aproximadamente 1:2, más particularmente preferiblemente 3:1 o aproximadamente 3:1 a 1:1 o aproximadamente 1:1. Las relaciones particularmente preferidas son 1:1 y 2:1.

Preferiblemente la FSH y LH se producen recombinantemente, particularmente preferiblemente se producen en células de ovario de hámster chino transfectada con un vector o vectores que comprende(n) DNA que codifica la subunidad alfa de la glicoproteína humana y la subunidad beta de FSH o LH. El DNA que codifica las subunidades alfa y beta puede estar presente en el mismo o diferentes vectores.

Las FSH y LH recombinantes tienen diversas ventajas sobre sus correspondientes de origen urinario. Las técnicas de cultivo y aislamiento que usan células recombinantes permiten la consistencia entre lotes. En contraste, las FSH y

- LH de origen urinario varían grandemente de lote a lote en características tales como la pureza, modelo de glicosilación, sialilación y oxidación de las subunidades. Debido a la mayor consistencia entre lotes y pureza de la FSH y la LH recombinantes, las hormonas pueden ser identificadas y cuantificadas usando técnicas tales como enfoque isoeléctrico (EIE). La facilidad con la cual las FSH y la LH recombinantes pueden ser identificadas y cuantificadas permite el llenado de viales por masa de hormona (llenado por masa) en lugar de llenado por bioensayo.
- Las formulaciones liofilizadas de la presente invención tienen un tampón de fosfato, siendo los contraiones preferidos sodio o potasio. Los tampones de solución salina de fosfato son bien conocidos en la técnica, tal como la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco. Las concentraciones de tampón en solución total pueden variar entre en o aproximadamente 5 mM, 9,5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, y 500 mM. Preferiblemente la concentración del tampón es 10 mM o aproximadamente 10 mM. Un tampón particularmente preferido es 10 mM en iones fosfato con un pH de 7,0.
- Preferiblemente el tampón se ajusta de tal modo que las formulaciones reconstituidas de las formulaciones liofilizadas de la presente invención tienen un pH entre 6,0 o aproximadamente 6,0 y 8,0 o aproximadamente 8,0, más preferiblemente entre 6,8 o aproximadamente 6,8 y 7,8 o aproximadamente 7,8, incluyendo aproximadamente pH 7,0, pH 7,2, y 7,4.
- Preferiblemente el tampón se ajusta de tal modo las formulaciones reconstituidas de mezclas de FSH y LH de la presente invención tengan un pH entre 6,0 o aproximadamente 6,0 y 9,0 o aproximadamente 9,0, más preferiblemente 6,8 o aproximadamente 6,8 y 8,5 o aproximadamente 8,5, incluyendo pH aproximadamente 7,0, 8,0, y 8,2, más preferiblemente 8,0 o aproximadamente pH 8,0.
- Con el fin de proporcionar una preparación inyectable, las formulaciones liofilizadas de la presente invención se reconstituyen usando un disolvente adecuado. Un disolvente preferido es agua para inyección.
- En una realización específica adicional la invención proporciona una formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 1. Preferiblemente la FSH y LH están presentes en una relación (FSH:LH) de 2:1 o aproximadamente 2:1 a 1:1 o aproximadamente 1:1.
- En una realización específica adicional la invención proporciona un método para fabricar una formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 22.
- En incluso otra realización preferida la invención proporciona un método para fabricar una composición farmacéutica envasada que comprende dispensar en un envase una mezcla liofilizada que consisten en SH, así como LH y un tensioactivo seleccionado de Tween 20 (monolaurato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 80 (monooleato de polioxietileno(20)-sorbitano), un antioxidante que es metionina, un tampón de fosfato y un estabilizador y agente de ajuste de la tonicidad seleccionado del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y azúcar-alcoholes.
- En incluso otra realización preferida, la invención proporciona un artículo de manufactura para uso farmacéutico humano de acuerdo con la reivindicación 19.
- Las formulaciones liofilizadas de la invención pueden mantenerse durante al menos aproximadamente 6 meses, 12 meses o 24 meses. En condiciones de conservación preferidas, antes del primer uso, las formulaciones se mantienen alejadas de luz intensa (preferiblemente en la oscuridad), a temperaturas de 25 o aproximadamente 25, preferiblemente de 2-8°C o aproximadamente 2-8°C, más preferiblemente de aproximadamente 4-5°C.
- Las formulaciones liofilizadas de la invención contienen un antioxidante que es metionina. El antioxidante impide la oxidación de FSH y LH (particularmente de la subunidad α).
- El antioxidante metionina está preferiblemente presente a una concentración de 0,001 o aproximadamente 0,001 a 0,1 o aproximadamente 0,1 mg por mg de formulación total, más preferiblemente a 0,01 o aproximadamente 0,01 a 0,075 o aproximadamente 0,075 mg/mg.
- En la formulación reconstituida la metionina está preferiblemente presente a una concentración de 0,01 o aproximadamente 0,01 a 1,0 o aproximadamente 1,0 mg/ml, más preferiblemente a 0,05 o aproximadamente 0,05 a 0,5 o aproximadamente 0,5 mg/ml, más preferiblemente 0,1 o aproximadamente 0,1 mg/ml.
- Las formulaciones liofilizadas de la invención contienen un mono- o di-sacárido o un azúcar-alcohol como estabilizador y agente de ajuste de la tonicidad, tal como sacarosa, dextrosa, lactosa, manitol y/o glicerol. El más preferido es sacarosa. En la formulación reconstituida la sacarosa está presente en 60 o aproximadamente 60 mg/ml.
- Como se ha indicado antes la invención proporciona formulaciones liofilizadas en particular para un solo uso. Las formulaciones de la invención son adecuadas para uso farmacéutico o veterinario.
- Como se ha indicado antes, en una realización preferida, la invención proporciona un artículo de manufactura, que comprende material de envase y un vial que comprende FSH y LH, así como Tween 20 liofilizados. El segundo envase incluye agua para inyección como diluyente.
- El intervalo de hormona proteínica en las formulaciones de la invención incluye cantidades que proporcionan por reconstitución, concentraciones de aproximadamente 1,0 μ g/ml a aproximadamente 50 mg/ml, aunque son operati-

vas concentraciones inferiores y superiores dependiendo del vehículo de administración previsto, por ejemplo, las formulaciones en solución diferirán del parche transdérmico, los métodos pulmonares, transmucosales u osmóticos o por micro- bomba. La concentración de hormona proteínica es preferiblemente 5,0 o aproximadamente 5,0 µg/ml a 2 o aproximadamente 2 mg/ml, más preferiblemente 10 o aproximadamente 10 µg/ml a 1 o aproximadamente 1 mg/ml, más preferiblemente 50 o aproximadamente 50 µg/ml a 200 o aproximadamente 200 µg/ml.

Preferiblemente las formulaciones de la invención retienen al menos 80% o aproximadamente 80% de la actividad de FSH y/o la actividad de LH en el momento del envasado en un periodo de 24 meses (antes del primer uso). La actividad de FSH se puede medir usando el bioensayo de ganancia de peso ovárico de Steelman-Pohley⁵. La actividad de LH se puede medir usando el bioensayo de ganancia de peso de la vesícula seminal.

Las formulaciones de la presente invención se pueden preparar por un proceso que comprende mezclar FSH y LH y Tween 20 así como más excipientes como un antioxidante y/o un tampón y someter la mezcla a una liofilización. Mezclar los componentes y liofilizarlos se lleva a cabo usando métodos convencionales. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, una cantidad medida de FSH o variante de FSH, LH o variante de LH se combina con Tween 20 y se liofiliza la mezcla resultante y luego se dispensa en viales, ampollas o cartuchos. Las variaciones de este proceso serían reconocidas por un experto ordinario en la técnica. Por ejemplo, el orden en el que se añaden de los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y pH a los cuales se prepara la formulación, son todos factores que pueden ser optimizados para la concentración y medios de administración usados.

Las formulaciones reconstituidas obtenidas a partir de las formulaciones liofilizadas de la invención se pueden administrar usando dispositivos reconocidos. Los ejemplos que comprenden estos sistemas de un solo vial incluyen dispositivos inyectoros de tipo pluma para administración de una solución, tales como EasyJect®, Gonal-F® Pen, Hurnaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen®, y OptiPen®.

Los productos actualmente reivindicados incluyen material envasado. El material envasado proporciona, además de la información requerida por las agencias reguladoras estatales, las condiciones bajo las cuales se debe usar el producto. El material envasado de la presente invención proporciona instrucciones al paciente para reconstituir la formulación liofilizada de la invención en el diluyente acuoso para formar una solución y para usar la solución durante un periodo de veinticuatro horas o más para el producto húmedo/seco de dos viales. Para el producto en solución en un solo vial la etiqueta indica que dicha solución puede ser conservada después del primer uso durante un periodo de veinticuatro horas o más, preferiblemente hasta 12 o 14 días. Los productos actualmente reivindicados son útiles para uso farmacéutico humano.

El siguiente ejemplo se facilita simplemente para ilustrar adicionalmente la preparación de las formulaciones y composiciones de la invención. Sin embargo, el alcance de la invención no ha de entenderse limitado simplemente al siguiente ejemplo.

Ejemplo

Las gonadotropinas recombinantes (FSH / LH) de los presentes ejemplos han sido preparadas por expresión en células CHO (de ovario de hámster chino), transformadas con el DNA recombinante correspondiente, de acuerdo con la técnica descrita en las patentes europeas EP 160699 y EP 211894.

Las otras sustancias usadas en los ejemplos son las siguientes:

- Sacarosa extra pura, código Merck 1.07653
- Dihidrógeno-fosfato sódico monohidrato (en lo sucesivo indicado como $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) código Merck 1.06346
- Hidrógeno-fosfato disódico dihidrato (en lo sucesivo indicado como $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) código Merck 1.06580
- Tween 20 código Merck 822184
- L-metionina Rexim
- Agua para inyección
- Ácido ortofosfórico al 85% extra puro, código Merck 1.00563
- Solución de ácido fosfórico (aprox. 17% p/p)
- Pelets de hidróxido de sodio extra puro, código Merck 1.06498

Formulación liofilizada de FSH y LH

Se preparó una formulación liofilizada A que tenía la siguiente composición:

Formulación A

FSH	12,0 µg (165 U.I.)
LH	3,7 µg (92 U.I.)
Sacarosa	30,0 mg
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,45 mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,11 mg
Tween 20	0,05 mg

L-metionina 0,1 mg

El proceso de fabricación consiste en mezclar la sustancia fármaco directamente con los ingredientes, filtrar la solución obtenida y liofilizar el filtrado. Una descripción de cada etapa del proceso se facilita a continuación:

- 5 – añadir en un envase tarado agua para inyección (API), dihidrógeno-fosfato de sodio, dihidrato, hidrógeno-fosfato disódico dihidrato, sacarosa, Tween 20 al 5% y L-metionina y agitar durante 10 minutos hasta di-solución completa.
- comprobar el pH y eventualmente corregirlo hasta $\text{pH } 7,00 \pm 0,2$ con NaOH al 10% o H_3PO_4 diluido
- añadir la FSH y la LH a la mezcla preparada anterior y agitar suavemente la solución obtenida durante 10 minutos
- 10 – comprobar de nuevo el pH y eventualmente ajustarlo $7,0 \pm 0,1$ con NaOH al 10% o H_3PO_4 diluido
- filtrar la solución con una membrana Durapore de $0,22 \mu\text{m}$ con una relación de filtración no inferior a 15 g/cm^2 , bajo un flujo de nitrógeno con una presión no superior a $1,5 \text{ atm}$
- recoger la solución en un matraz previamente esterilizado
- llenar la solución filtrada en un envase de vidrio, ajustar el tapón, y colocar los viales cargados en una bandeja de acero inoxidable
- 15 – cargar las bandejas en un liofilizador y liofilizar el producto usando el siguiente ciclo de liofilización:
 - equilibrar a $+4^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 20 minutos
 - llevar la temperatura de los estantes a -25°C y mantenerla durante 2 horas
 - llevar la temperatura de los estantes a -15°C y mantenerla durante 1 hora
 - 20 • llevar la temperatura de los estantes a -45°C y mantenerla durante 3 horas
 - llevar la temperatura del condensador a -65°C .
 - aplicar vacío a la cámara
 - cuando el vacío alcance un valor de $7 \times 10^{-2} \text{ mBar}$ elevar la temperatura de los estantes hasta -10°C y mantenerla durante 14 horas
 - 25 • elevar la temperatura de los estantes hasta $+35^\circ\text{C}$ en 8 horas y mantenerla hasta el final del ciclo (14 horas)
 - eliminar el vacío dejando entrar en la cámara nitrógeno seco
 - realizar el cierre con tapón del liofilizador por sistema automático
 - cerrar herméticamente los viales tapados con las cápsulas apropiadas de encaje a presión (del tipo *flip-off*).
 - 30

Las formulaciones A y B se conservaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, y se analizó su estabilidad y actividad biológica como se indica más adelante. Antes de analizar las composiciones, se reconstituyen usando agua para inyección.

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

- 35 • ensayo *in vivo* para la FSH: Se analizó la actividad de FSH de la formulación usando el bioensayo de ganancia de peso ovárico de Steelman-Pohley
- ensayo *in vivo* para la LH: Se analizó la actividad de LH de la formulación usando el bioensayo de ganancia de peso de la vesícula seminal en ratas.
- Ensayo de la subunidad alfa oxidada: El porcentaje de la subunidad alfa oxidada se midió por el método de HPLC de fase inversa (RP-HPLC)
- 40 • Evaluación de la subunidad libre (rFSH + rLH): El porcentaje de la unidad libre se evaluó por SDS-PAGE. .
- Evaluación de agregados: El porcentaje de agregados se evaluó por SDS-PAGE como se ha descrito antes para la evaluación de la subunidad libre.

- 45 Los ensayos biológicos fueron realizados cumpliendo con las regulaciones de la Farmacopea europea. En particular los ensayos se describen en la monografía "Menotropina".

La Tabla 1 resume los resultados de los ensayos analíticos relacionados con la estabilidad y la actividad biológica de la formulación A. Los valores se determinaron en 4 puntos de comprobaciones: a tiempo cero, después de 1 mes, 3 meses y 6 meses de conservación, a una temperatura de conservación de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

TABLA 1

ENSAYO	TIEMPO CERO	1 MES	3 MESES	6 MESES
Actividad biológica de la FSH en U.I.	154	136	133	154
Actividad biológica de la LH en U.I.	93	86	94	80
% de producto oxidado	1,0	1,2	2,0	1,0
% de dímeros/agregados	<2	<2	<2	<2
% de subunidades libres	<5	<5	<5	<5

En la Tabla 2 se resumen los resultados de la estabilidad y la actividad biológica de la formulación A conservada a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ para 4 comprobaciones: a tiempo cero, después de 3 meses, 6 meses y 9 meses de conservación.

5

TABLA 2

ENSAYO	TIEMPO CERO	3 MESES	6 MESES	9 MESES
Actividad biológica de FSH, U.I.	154	139	157	146
Actividad biológica de LH, U.I.	93	102	88	92
% de producto oxidado	1,0	0,9	1,0	1,0
% de dímeros/agregados	<2	<2	<2	<2
% de subunidades libres	<5	<5	<5	<5

De las Tablas se puede deducir que la actividad biológica de la formulación A se mantiene bien después 9 meses de conservación. La formulación tenía una alta estabilidad.

Secuencias:

10 SEQ ID NO. 1: subunidad α de la glicoproteína humana;

SEQ ID NO. 2: subunidad β de hFSH;

SEQ ID NO. 3: subunidad β de variante 1 de la hFSH

SEQ ID NO. 4: subunidad β de variante 2 de la hFSH

SEQ ID NO. 5: subunidad β de variante 3 de la hFSH

15 SEQ ID NO. 6: subunidad β de hLH

Referencias

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

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

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

25 ⁴Reichert LE, Ramsey RB; Dissociation of human follicle-stimulating hormone; *J. Biol. Chem.*; **1975**, 250, 3034-3040.

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

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

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

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	ARES TRADING SA
	<120>	Formulaciones liofilizadas de FSH / LH
5	<130>	EP 849 Z
	<160>	6
10	<170>	PatentIn version 3.1
	<210>	1
	<211>	91
	<212>	PRT
15	<213>	Homo sapiens
	<400>	1
		Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro
		1 5 10 15
		Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys
		20 25 30
		Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu
		35 40 45
		Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser
		50 55 60
		Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Val Glu Asn His Thr Ala
		65 70 75 80
		Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
		85 90
20	<210>	2
	<211>	129
	<212>	PRT
	<213>	Homo sapiens
25	<400>	2

ES 2 414 705 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu

<210> 3

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

ES 2 414 705 T3

1					5					10					15				
Cys	Arg	Phe	Cys	Ile	Ser	Ile	Asn	Thr	Thr	Trp	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys				
			20				25						30						
Tyr	Thr	Arg	Asp	Leu	Val	Tyr	Lys	Asp	Pro	Ala	Arg	Pro	Lys	Ile	Gln				
			35				40						45						
Lys	Thr	Cys	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Val	Tyr	Glu	Thr	Val	Arg	Val	Pro				
			50				55						60						
Gly	Cys	Ala	His	His	Ala	Asp	Ser	Leu	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Val	Ala	Thr				
			65				70						75						
Gln	Cys	His	Cys	Gly	Lys	Cys	Asp	Ser	Asp	Ser	Thr	Asp	Cys	Thr	Val				
						85									95				
Arg	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Tyr	Cys	Ser	Phe	Gly	Glu								
						100													
						105													

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

```

<400>      4
Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu Cys Arg
 1              5              10              15
Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr Arg
      20              25              30
Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln Lys Thr Cys
      35              40              45
Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro Gly Cys Ala
      50              55              60
His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Val Pro Val Ala Thr Gln Cys His
      65              70              75              80
Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu
      85              90              95
Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met
      100              105

```

<210> 5

ES 2 414 705 T3

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

5 <400> 5

```

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

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

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

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

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

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

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

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

10

<400> 6

```

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

ES 2 414 705 T3

Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Cys	Pro	Val	Cys	Ile	Thr	Val	Asn	Thr	Thr			
			20					25					30					
Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Pro	Thr	Met	Arg	Val	Leu	Gln	Ala	Val	Leu			
		35					40					45						
Pro	Pro	Leu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Tyr	Arg	Asp	Val	Arg	Phe	Glu	Ser			
	50					55					60							
Ile	Arg	Leu	Pro	Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Val	Asp	Pro	Val	Val	Ser	Phe			
65					70					75					80			
Pro	Val	Ala	Leu	Ser	Cys	Arg	Cys	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Ser	Thr	Ser			
			85						90					95				
Asp	Cys	Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	His	Pro	Leu	Thr	Cys	Asp	His	Pro	Gln			
			100					105					110					

REIVINDICACIONES

1. A formulación liofilizada que consiste en la hormona estimulante de los folículos (FSH) o una de sus variantes, así como hormona luteinizante (LH) o una de sus variantes, un tensioactivo seleccionado de un polisorbato que incluye Tween 20 (monolaurato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 80 (monooleato de polioxietileno(20)-sorbitano), un antioxidante que es metionina, un tampón de fosfato y un estabilizador y agente de ajuste de la tonicidad seleccionado del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y azúcar-alcoholes.
2. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tensioactivo es Tween 20.
3. La formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la hormona estimulante de los folículos es la hormona estimulante de los folículos humana y/o la hormona luteinizante (LH) es la hormona luteinizante (LH) humana.
4. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la hormona estimulante de los folículos es la hormona estimulante de los folículos humana urinaria y/o la hormona luteinizante (LH) es la hormona luteinizante (LH) humana urinaria.
5. La formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la hormona estimulante de los folículos es la hormona estimulante de los folículos humana recombinante y/o la hormona luteinizante (LH) es hormona luteinizante (LH) humana recombinante.
6. La formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la hormona estimulante de los folículos (FSH) está presente a una concentración (p/p) de 0,1 a 10 o aproximadamente 0,1 a 10 µg/mg de la formulación total.
7. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la hormona estimulante de los folículos (FSH) está presente a una concentración de 0,3 a 5 o aproximadamente 0,3 a 5 µg/mg de la formulación total.
8. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la hormona estimulante de los folículos (FSH) está presente a una concentración de 0,37 a 2 o aproximadamente 0,37 a 2 µg/mg de la formulación total.
9. La formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la hormona luteinizante (LH) está presente a una concentración de 0,1 a 3 o aproximadamente 0,1 a 3 µg/mg de la formulación total.
10. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la hormona luteinizante (LH) está presente a una concentración de 0,1 a 1 o aproximadamente 0,1 a 1 µg/mg de la formulación total.
11. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la hormona luteinizante (LH) está presente a una concentración de 0,1 a 0,6 o aproximadamente 0,1 a 0,6 µg/mg de la formulación total.
12. La formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la relación de FSH a LH está dentro del intervalo de 6:1 o aproximadamente 6:1 a 1:6 o aproximadamente 1:6.
13. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la relación de FSH a LH está dentro del intervalo de 4:1 o aproximadamente 4:1 a 1:2 o aproximadamente 1:2.
14. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la relación de FSH a LH está dentro del intervalo de 3:1 o aproximadamente 3:1 a 1:1 o aproximadamente 1:1.
15. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la relación de FSH a LH está dentro del intervalo de 2:1 a 1:1 o aproximadamente 2:1 a 1:1.
16. La formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el estabilizador y agente de ajuste de la tonicidad es sacarosa.
17. La formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que consiste en los siguientes ingredientes: rFSH, rLH, Tween 20, sacarosa, metionina, y un tampón de fosfato.
18. La formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la cual las cantidades relativas en peso de los componentes comprenden 12,0 µg de FSH recombinante, 3,7 µg de LH recombinante, 30,0 mg de sacarosa, 0,45 mg de NaH₂PO₄ · H₂O, 1,11 mg de Na₂HPO₄ · 2H₂O, 0,05 mg de Tween 20 y 0,1 mg de L-metionina.
19. Un artículo de manufactura que comprende un primer envase lleno con una formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y un segundo envase que comprende un disolvente para reconstitución.
20. Un artículo de manufactura de acuerdo con la reivindicación 19, en el cual el segundo envase contiene agua para reconstitución.

- 5 21. Un método de fabricar una formulación liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende la etapa de formar una mezcla que consiste en FSH con LH, así como un tensioactivo seleccionado de un polisorbato que incluye Tween 20 (monolaurato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno(20)-sorbitano), Tween 80 (monooleato de polioxietileno(20)-sorbitano), un antioxidante que es metionina, un tampón de fosfato y un estabilizador y agente de ajuste de la tonicidad seleccionado del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y azúcar-alcoholes y someter la mezcla a liofilización.