



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2219607 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 9/08 (2006.01)
A61K 38/24 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61P 5/06 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2012.09.10
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.08.15
(86)	Europeisk søknadsnr	08844750.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.10.29
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.08.25
(30)	Prioritet	2007.11.01, EP 07119832 2007.11.28, US 4481 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	Merck Serono S.A., Centre Industriel, 1267 Coinsins, Sveits
(72)	Oppfinner	AGOSTINETTO, Rita, Via Valle San Lorenzo 2E5, I-00040 Rocca Di Papa (RM), Italia SAMARITANI, Fabrizio, Via Luigi Chiala 130, I-00139 Roma, Italia DEL RIO, Alessandra, Via Ildebrando Vivanti 108, I-00144 Roma, Italia RICHARD, Joel, 5 Rue de Bretagne, F-78490 Montfort L' Amaury, Frankrike
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Flytende farmasøytiske formuleringer av luteiniserende hormon (LH)
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 0 448 146 B1 US-A1- 2004 224 886 B1 MANNING M C ET AL: "STABILITY OF PROTEIN PHARMACEUTICALS" PHARMACEUTICAL RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 6, no. 11, 1 November 1989 (1989-11-01), pages 903-918, XP000646809 ISSN: 0724-8741

Oppfinnelsens område

Oppfinnelsen vedrører fagområdet for flytende farmasøytiske formuleringer av luteiniserende hormon (LH) i tillegg til fremgangsmåter for fremstilling av slike formuleringer.

5

Bakgrunn for oppfinnelsen

Luteiniserende hormon (LH), follikkelstimulerende hormon (FSH) og chorionisk gonadotropin (CG) er injiserbare proteiner som tilhører klassen av gonadotropiner. LH, FSH og CG blir benyttet alene eller i kombinasjon i behandlingen av infertilitet og reproduksjonsforstyrrelser hos både kvinnelige og mannlige pasienter.

10

I naturen blir FSH og LH produsert i hypofysen. For anvendelse farmasøytisk kan FSH og LH og deres varianter bli produsert rekombinant (rFSH og rLH) eller de kan bli produsert fra urinen til kvinner i postmenopause (uFSH og uLH).

FSH blir benyttet på kvinnelige pasienter i ovuleringsinduksjon (OI) og i kontrollert ovariestimulering (COH) for assisterte reproduktive teknologier (ART). I et typisk behandlingsregime for ovuleringsinduksjon blir en pasient administrert daglige injeksjoner med FSH eller en FSH-variant (omtrent 75 til 300 IU FSH/dag) i en periode på fra 6 til omtrent 12 dager. I et typisk behandlingsregime for kontrollert hyperstimulering blir en pasient administrert daglige injeksjoner med FSH eller en FSH-variant (omtrent 150-600 IU FSH/dag) i en periode på fra omtrent 6 til omtrent 12 dager.

15

20

FSH blir også benyttet for å indusere spermatogenese hos menn som lider av oligospermi. Et regime som benytter 150 IU FSH 3 ganger ukentlig i kombinasjon med 2500 IU hCG to ganger ukentlig har vært vellykket i å oppnå en forbedring av spermicantall hos menn som lider av hypogonadotrofisk hypogonadisme (Burgues et al., 1997).

25

LH blir benyttet på kvinnelige pasienter i kombinasjon med FSH i OI og i COH, spesielt i de pasientene som har svært lave endogene LH-nivåer eller resistens overfor LH, slik som kvinner som lider av hypogonadotrofisk hypogonadisme (HH, WHO-gruppe-I) eller eldre pasienter (d.v.s. 35 år eller eldre), og pasienter der embryoimplantering eller tidlig spontanabort er et problem. LH i kombinasjon med FSH har tradisjonelt vært tilgjengelig i et preparat kalt humane menopause-gonadotropiner (hMG) ekstrahert fra urinen til kvinner i postmenopause. hMG har et forhold 1:1 for aktivitet av FSH:LH.

30

CG virker på den samme reseptoren som LH og utløser den samme responsen. CG har en lengre sirkulasjonshalveringstid enn LH og blir derfor ofte benyttet som en lengevirkende kilde for LH-aktivitet. CG blir benyttet i OI- og COH-regimer for å herme den naturlige LH-toppen og utløse ovulering. En injeksjon med humant

35

chorionisk gonadotropin (hCG) blir benyttet for å utløse ovulering på slutten av stimulering med FSH eller en blanding av FSH og LH. CG kan også bli benyttet sammen med FSH under stimulering for OI og COH, for å tilveiebringe LH-aktivitet under stimulering hos pasienter der LH-aktivitet er ønskelig, slik som de som er nevnt ovenfor.

FSH, LH og CG er medlemmer av den heterodimere glykoprotein-hormonfamilien som også inkluderer tyroidstimulerende hormon (TSH). Medlemmene av denne familien er heterodimerer, som omfatter en α - og en β -subenhet. Subenhetene blir holdt sammen med ikke-kovalente interaksjoner. Den humane FSH- (hFSH) dimeren består av (i) en moden glykoprotein-alfasubenhet på 92 aminosyrer, som også er felles for de andre humane familiemedlemmene (d.v.s. chorionisk gonadotropin ("CG"), luteiniserende hormon ("LH") og tyroidstimulerende hormon ("TSH")), og (ii) en betasubenhet på 111 aminosyrer som er unik for FSH (Shome et al., 1974 og 1988). De humane LH-heterodimerene består av (i) den modne glykoprotein-alfasubenheten på 92 aminosyrer, og (ii) en moden betasubenhet på 112 aminosyrer som er unik for LH (Keutmann et al., 1979, Talmadge et al., 1984, Fiddes & Talmadge, 1984). Alfa- og betasubenhetene for glykoproteinene kan være utsatt for å dissosiere i formuleringer på grunn av interaksjon med et preserveringsmiddel, overflateaktivt middel og andre eksipienser. Dissosiering av subenhetene fører til tap av biologisk aktivitet (Reichert & Ramsey, 1975).

FSH blir formulert for intramuskulær (IM) eller subkutan (SC) injeksjon. FSH blir levert i lyofilisert (fast) form i rør eller ampuller med 75 IU/rør og 150 IU/rør med en lagringstid på omtrent to år når det lagres ved 2-25 °C. En løsning for injeksjon blir klargjort ved å rekonstituere det lyofiliserte produktet med vann for injeksjon (WFI). For ovuleringsinduksjon eller kontrollert ovariehyperstimulering er daglige injeksjoner med startdoser på 75 IU til 600 IU anbefalt i opp til omtrent ti dager. Avhengig av pasientens respons kan opp til tre sykluser med behandling med økende doser av FSH bli benyttet. Med lyofiliserte formuleringer må pasienten rekonstituere et nytt rør med lyofilisert materiale med fortynningsmiddel og administrerer det umiddelbart etter rekonstituering på en daglig basis [Forpakkingsinnstikk N1700101A, publisert i februar 1996, for Fertinex (urofollitropin for injeksjon, rensset) for subkutan injeksjon, fra Serono Laboratories, Inc., Randolph, MA].

FSH har også blitt formulert i både flytende enkeltdose- og multidoseformater, i rør eller ampuller. Enkeltdoseformater må forbli stabile og aktive under lagring før anvendelse.

Multidoseformater må ikke bare forbli stabile og aktive under lagring før anvendelse, men må også forbli stabile, aktive og relativt frie for bakterier over administreringsperioden på flere dager, etter at forseglingen på ampullen har blitt brutt. På grunn av dette inneholder multidoseformater ofte et bakteriostatisk middel.

- LH er formulert for intramuskulær (IM) eller subkutan (SC) injeksjon. LH blir levert i lyofilisert (fast) form i rør eller ampuller med 75 IU/rør med en lagringstid på omtrent to år når det lagres ved 2-25 °C. En løsning for injeksjon blir klargjort ved å rekonstituere det lyofiliserte produktet med vann for injeksjon (WFI). For
- 5 ovulasjonsinduksjon eller kontrollert ovariehyperstimulering, sammen med FSH, så er daglige injeksjoner med startdoser på 75 IU til 600 IU med LH anbefalt i opptil omtrent ti dager.
- EP 0 618 808 (Applied Reasearch Systems ARS Holding N.V.) tilkjennelegger et
- 10 farmasøytisk preparat som omfatter en fast intim blanding av gonadotropin og en stabiliserende mengde sukrose alene eller i kombinasjon med glysin.
- EP 0 814 841 (Applied Reasearch Systems ARS Holding N.V.) tilkjennelegger et stabilt, flytende farmasøytisk preparat som omfatter rekombinant, humant chorionisk gonadotropin (hCG) og en stabiliserende mengde mannitol.
- WO 2004/087213 (Ares Trading S.A.) tilkjennelegger et flytende og frysetørket
- 15 farmasøytisk preparat som omfatter follikkelstimulerende hormon (FSH) eller en variant derav og/eller luteiniserende hormon (LH) eller en variant derav i tillegg til et overflateaktivt middel valgt fra Pluronic F77, Pluronic F87, Pluronic F88 og Pluronic F68.
- WO 2004/112826 (Ares Trading S.A.) tilkjennelegger en frysetørket formulering som
- 20 omfatter follikkelstimulerende hormon (FSH) eller en variant derav og luteiniserende hormon (LH) eller en variant derav i tillegg til et overflateaktivt middel valgt fra et polysorbat som inkluderer Tween 20, Tween 40 og Tween 80.
- WO 00/04913 (Eli Lilly & Co.) tilkjennelegger en formulering som omfatter FSH eller en FSH-variant, inneholdende en alfa- og beta-subenhet, og et
- 25 preserveringsmiddel som er valgt fra gruppen som består av fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, klorcresol, benzylalkohol, alkylparaben (metyl, propyl, butyl og liknende), benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid, natriumdehydroacetat og timerosal, eller blandinger derav i et vandig fortynningsmiddel.
- WO 2004/105788 (Ferring B.V.) tilkjennelegger et farmasøytisk preparat som består
- 30 av FSH og hCG i minst én farmasøytisk akseptabel bærer.
- EP 0 448 146 (AKZO N.V.) tilkjennelegger et stabilisert gonadotropininnholdende lyofilisat som omfatter et gonadotropin og en stabiliserende mengde med et dikarboksylysyresalt.
- EP 0 853 945 (Akzo Nobel N.V.) tilkjennelegger en flytende
- 35 gonadotropininnholdende formulering som er kjennetegnet ved at formuleringen omfatter et gonadotropin og stabiliserende mengder med en polykarboksylsyre eller et salt derav og en tioeterforbindelse.

Det er fremdeles et behov for stabile, flytende formuleringer av LH eller en LH-variant enten for enkeltdose- eller multidoseadministrering.

Oppsummering av oppfinnelsen

- 5 Det er et mål for oppfinnelsen å tilveiebringe flytende formuleringer av LH eller LH-variant, fremgangsmåter for deres fremstilling og fremgangsmåter for deres farmasøytiske eller veterinærmessige anvendelse i behandlingen av fertilitetsforstyrrelser.
- 10 I et første aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en flytende formulering av LH eller en LH-variant som omfatter et rensset preparat av LH eller LH-variant, en fosfatbuffer og en stabiliserende mengde med arginin eller salter derav og/eller lysin eller salter derav, ifølge krav 1.
- 15 I et andre aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en prosess for fremstillingen av en flytende formulering av LH eller LH-variant som omfatter trinnene a) danne en løsning av LH eller LH-variant, og b) tilsette til nevnte løsning en stabiliserende mengde med arginin eller salter derav og/eller lysin eller salter derav, og fosfatbuffer, ifølge krav 23.
- 20 I et tredje aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en presentasjonsform av en flytende formulering av LH eller LH-variant som omfatter den flytende formuleringen ifølge oppfinnelsen, hermetisk forseglet ved sterile betingelser i en beholder som er passende for lagring før anvendelse. Beholderen kan være en ampulle, et rør, en sprøyte eller en hylse, ifølge krav 22.
- 25 I et fjerde aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremstilt artikkel for human farmasøytisk anvendelse som omfatter forpakkingsmateriale og en beholder som omfatter den flytende formuleringen av LH eller LH-variant ifølge oppfinnelsen og et bakteriostatisk middel, der nevnte forpakkingsmateriale omfatter et merke som indikerer at en slik formulering kan bli holdt over en periode på tjueåtte dager eller mer etter den første anvendelsen.
- 30 Det er et ytterligere mål for oppfinnelsen å tilveiebringe anvendelsen av en flytende formulering av LH eller LH-variant ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med flytende formuleringer av FSH eller FSH-variant, ifølge krav 26.

Kort beskrivelse av tegningene

- 35 Figur 1 viser sammenligningen av kromatografiske profiler (ved SE-HPLC) av r-hLH-formuleringer med ulike konsentrasjoner (6, 12 og 24 µg/ml med r-hLH), beholdere (sprøyte og hylse) og fyllvolumer (0,25, 0,5 og 1 ml). Disse formuleringene inneholder i tillegg til r-hLH fosfatbuffer, sakkarose, Tween 20, metionin, benzylalkohol, benzalkoniumklorid og vann for injeksjon. De prikkede

- linjene tilsvarer et fyllvolum på 0,25 ml, de strekede linjene tilsvarer et fyllvolum på 0,5 ml, og de svarte linjene tilsvarer et fyllvolum på 1 ml. (A) 6 µg/ml r-hLH-formulering i sprøyte. (B) 6 µg/ml r-hLH-formulering i hylse. (C) 12 µg/ml r-hLH-formulering i sprøyte. (D) 12 µg/ml r-hLH-formulering i hylse. (E) 24 µg/ml r-hLH-formulering i sprøyte. (F) 24 µg/ml r-hLH-formulering i hylse. Toppene ved en retensjonstid på 8,5 minutter tilsvarer de intakte heterodimerene (alfa-+betasubenheter koblet sammen med en ikke-kovalent binding), mens topper med høyere retensjonstid (omtrent 9,5 minutter) tilsvarer de frie subenhetene. AU: absorbansehet.
- Figur 2 viser sammenligningen av prosentandelen av heterodimerer beregnet med SE-HPLC på formuleringen med og uten kombinasjonen med bakteriostatisk midler, henholdsvis SAC/500/24µgBACL_cart og SAC/500/24µg_cart. (A) SE-HPLC utført etter tre dager (3d) med lagring ved +40 °C. (B) SE-HPLC utført etter åtte dager (8d), fire uker (4w), seks uker (6w), åtte uker (8w) og tretten uker (13w) med lagring ved +33 °C.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

- De flytende LH-formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse har forbedrede og mer hensiktsmessige egenskaper eller stabilitet, og er nyttige for infertilitetsbehandling hos kvinner og/eller menn.

I en foretrukket utførelsesform er de flytende formuleringene ifølge oppfinnelsen til subkutan og/eller intramuskulær injeksjon.

- De hensiktsmessige egenskapene eller stabiliteten til de flytende LH- eller LH-variantformuleringene ifølge oppfinnelsen blir oppnådd ved å forhindre eller redusere tap av aktivitet eller stabilitet, eller ved å forbedre ethvert aspekt av effektiviteten eller ønskeligheten for administrering, for eksempel med i det minste én av modus, hyppighet, dosering, bekvemmelighet, enkelhet ved anvendelse og liknende.

- Luteiniserende hormon, eller LH, refererer slik det blir benyttet her til LH produsert som et modent fullengdeprotein, som inkluderer, men som ikke er begrenset til humant LH eller "hLH", uansett om det er produsert rekombinant eller isolert fra humane kilder, slik som urinen fra kvinner i postmenopause.

- Uttrykket "LH-variant" er ment å skulle omfatte de molekylerne som er forskjellige i aminosyresekvens, glykosyleringsmønster eller ved kobling mellom subenheter fra humant LH men som oppviser LH-aktivitet.

Uttrykket "aktivitet" med hensyn på LH refererer til evnen til en LH-formulering eller en blandet formulering til å utløse biologiske prosesser som er assosiert med

LH, slik som sædblærevektøkingsfremgangsmåten (Van Hell et al., 1964).

Biologisk aktivitet for LH blir evaluert med hensyn på en akseptert standard for LH.

Mål på aktivitet blir uttrykt i Internasjonale Enheter per milliliter løsning (IU/ml) eller i Mega Internasjonale Enheter per milliliter løsning (MIU/ml). (1 MIU/ml = 1 000 000 IU/ml). En Internasjonal Enhet blir beregnet som beskrevet i Research Reference Reagent Note No. 35, publisert av the National Institute of Health, Bethesda, Maryland.

LH eller LH-variant kan bli produsert med enhver passende fremgangsmåte, slik som rekombinant, ved isolering eller rensing fra naturlige kilder som kan være tilfellet, eller ved kjemisk syntese, eller enhver kombinasjon derav.

Anvendelsen av uttrykket "rekombinant" refererer til preparater av LH eller en LH-variant som blir produsert ved anvendelsen av rekombinant DNA-teknologi (se for eksempel WO 85/1958). Ett eksempel på en fremgangsmåte for uttrykking av LH ved å benytte rekombinant teknologi er ved transfeksjon av eukaryote celler med DNA-sekvensene som koder for en alfa- og betasubenheter av LH, uavhengig om de er tilveiebrakt på én vektor eller på to vektorer der hver subenhet har en separat promotor, som beskrevet i patentene EP 0 211 894 og EP 0 487 512.

Et annet eksempel på anvendelsen av rekombinant teknologi for å produsere LH er ved anvendelsen av homolog rekombinasjon for å sette inn et heterologt regulatorisk segment i opererbar kobling til endogene sekvenser som koder for subenheter for LH, som beskrevet i patentet EP 0 505 500 (Applied Research Systems ARS Holding NV).

Follikkelstimulerende hormon, eller FSH, refererer slik det blir benyttet her til FSH som er produsert som et modent fullengdeprotein som inkluderer, men som ikke er begrenset til, humant FSH eller "hFSH", uansett om det er produsert rekombinant eller isolert fra humane kilder, slik som urinen fra kvinner i postmenopause.

Uttrykket "FSH-variant" er ment å skulle omfatte de molekylerne som er forskjellige i aminosyreskvens, glykosyleringsmønster eller i kobling mellom subenheter fra humant FSH, men som oppviser FSH-aktivitet.

Uttrykket "aktivitet" med hensyn på FSH refererer til evnen til en FSH-formulering eller en blandet formulering til å utløse biologiske prosesser som er assosiert med FSH, slik som ovarievektøkning i Steelman-Pohley-analysen (Steelman et al., 1953), eller follikkelvekst hos en kvinnelig pasient. Follikkelvekst hos en kvinnelig pasient kan bli evaluert ved hjelp av ultralyd, for eksempel i kraft av antallet follikler som har en gjennomsnittlig diameter på eller ved omkring 16 mm på dag 8 med stimulering. Biologisk aktivitet blir evaluert med hensyn på en akseptert standard for FSH.

Eksempler på FSH-variant inkluderer CTP-FSH, som er en lengevirkende modifisert rekombinant FSH, som består av villtype- α -subenheten og en hybrid- β -

subenhet der det karboksyterminale peptidet fra hCG har blitt fusjonert til C-terminalen på β -subenheten på FSH, som beskrevet av LaPolt et al., (1992) eller i Klein et al., (2003). Også inkludert er enkeltkjede-CTP-FSH, som er et enkeltkjedemolekyl som består av de følgende sekvensene (fra N-terminal til C-terminal):

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

der β FSH betegner β -subenheten og FSH, β hCG-CTP(113-145) betegner det karboksyterminale peptidet fra hCG og α FSH betegner α -subenheten til FSH, som beskrevet av Klein et al. (2002).

10 Andre eksempler på FSH-varianter inkluderer FSH-molekyler som har ytterligere glykosylerings seter inkorporert i α - og/eller β -subenheten, som tilkjenngjort i WO 01/58493 (Maxygen), spesielt som tilkjenngjort i kravene 10 og 11 i WO 01/58493, og FSH-molekyler med S-S-bindinger mellom subenheter, som tilkjenngjort i WO 98/58957.

15 FSH eller FSH-variant kan bli produsert med enhver passende fremgangsmåte, slik som rekombinant, ved isolering eller rensing fra naturlige kilder som kan være tilfellet, eller ved kjemisk syntese, eller enhver kombinasjon derav.

FSH eller FSH-varianten som blir benyttet i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse kan bli fremstilt ikke bare rekombinant, inkludert fra pattedyrceller, 20 men kan også bli rensset fra andre biologiske kilder, slik som fra urinkilder. Akseptable metodikker inkluderer de som er beskrevet i 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), US-patent 3,119,740 og US-patent nr. 5,767,067.

25 Uttrykket "administrere" eller "administrering" betyr å introdusere en formulering ifølge foreliggende oppfinnelse inn i kroppen til en pasient med behov for dette for å behandle en sykdom eller tilstand.

Uttrykket "pasient" betyr et pattedyr som blir behandlet for en sykdom eller tilstand. Pasienter er av, men ikke begrenset til, følgende opphav, menneskelig, får, svin, hest, oksedyr, kanin og liknende.

30 Uttrykket "vandig fortynningsmiddel" refererer til et flytende løsningsmiddel som inneholder vann. Vandige løsningsmiddelsystemer kan bestå av kun vann, eller kan bestå av vann pluss ett eller flere blandbare løsningsmidler, og kan inneholde oppløste forbindelser slik som sukkertyper, buffere, salter eller andre eksipienser. De mer vanlig benyttede ikke-vandige løsningsmidlene er de kortkjedede organiske 35 alkoholene slik som metanol, etanol, propanol, kortkjede-ketoner slik som aceton, og polyalkoholer slik som glyserol.

Et "isotonisitetsmiddel" er en forbindelse som blir fysiologisk tolerert og påfører en passende tonisitet til en formulering for å forhindre netto strømmingen av vann over cellemembraner som er i kontakt med formuleringen.

5 Forbindelser slik som glyserin blir vanlig benyttet til slike formål ved kjente konsentrasjoner. Andre passende isotonisitetsmidler inkluderer, men er ikke begrenset til, aminosyrer eller proteiner (for eksempel glysin eller albumin), salter (for eksempel natriumklorid) og sukkertyper (for eksempel dekstrose, sukrose og laktose).

10 Uttrykket "bakteriostatisk" eller "bakteriostatisk middel" refererer til en forbindelse eller preparat som blir tilsatt en formulering for å virke som et antibakterielt middel. LH- eller LH-variantinnholdende formulering ifølge foreliggende oppfinnelse oppfyller fortrinnsvis lovbestemte eller regulatoriske retningslinjer for

15 Eksempler på bakteriostatiske midler inkluderer fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, klorcresol, benzylalkohol, alkylparaben (metyl, etyl, propyl, butyl og liknende), benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid, natriumdehydroacetat og timerosal.

Uttrykket "buffer" eller "fysiologisk akseptabel buffer" refererer til løsninger av forbindelser som er kjent for å være trygge for farmasøytisk eller veterinærmessig bruk i formuleringer og som har effekten av å opprettholde eller kontrollere pH-
20 verdien i formuleringen i pH-området som er ønskelig for formuleringen. Akseptable buffere for kontrollering av pH ved en moderat sur pH til en moderat basisk pH inkluderer, men er ikke begrenset til, slike forbindelser som fosfat, acetat, citrat, arginin, TRIS og histidin, "TRIS" refererer til 2-amino-2-hydroksymetyl-1,3-
25 propandiol, og til ethvert farmakologisk akseptabelt salt derav. Foretrukne buffere er fosfatbuffere med saltløsning eller et akseptabelt salt.

Uttrykket "fosfatbuffer" refererer til løsninger som inneholder fosforsyre eller salter derav, justert til en ønsket pH-verdi. Generelt blir fosfatbuffere fremstilt fra fosforsyre, eller et salt av fosforsyre, inkludert men ikke begrenset til natrium- og
30 kaliumsalter. Flere salter av fosforsyre er kjent på fagområdet, slik som natrium- og kaliummonobasiske, -dibasiske og -tribasiske salter av syren. Salter av fosforsyre er også kjent for å eksistere som hydrater av det foreliggende saltet. Fosfatbuffere kan dekke et område med pH-verdier slik som fra omtrent pH 4 til omtrent pH 10, og foretrukne områder fra omtrent pH 5 til omtrent pH 9, og et mest foretrukket
35 område på eller omtrent 7,5 til på eller omtrent 8,5, mest foretrukket på eller omtrent pH 8,0.

Uttrykket "rør" eller "beholder" refererer grovt sett til et reservoar som er passende for å holde på LH og fortynningsmiddel i en innelukket steril tilstand. Eksempler på et rør slik det benyttes her inkluderer ampuller, hylser, blisterpakker, eller annet

slikt reservoar som er passende for levering av LH til pasienten via sprøyte, pumpe (inkludert osmotisk), kateter, transdermalt plaster, pulmonal eller transmukosal spray. Rør som er hensiktsmessige for pakking av produkter til parenteral, pulmonal, transmukosal eller transdermal administrering er velkjente og anerkjente på fagområdet.

Uttrykket "stabilitet" refererer til den fysiske, kjemiske og konformasjonsmessige stabiliteten til LH i formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse (inkludert vedlikehold av biologisk aktivitet). Ustabilitet for en proteinformulering kan være forårsaket av kjemisk degradering eller aggregering av proteinmolekylene for å danne polymerer av høyere orden, ved dissosiering av heterodimerene til monomerer, deglykosylering, modifisering av glykosylering, oksidasjon (spesielt av α -subenheten) eller enhver annen strukturell modifisering som reduserer minst én biologisk aktivitet for et LH-polypeptid inkludert foreliggende oppfinnelse.

En "stabil" løsning eller formulering er én der graden av degradering, modifisering, aggregering, tap av biologisk aktivitet og liknende, av proteiner i disse er akseptabelt kontrollert, og som ikke øker uakseptabelt over tid. Fortrinnsvis opprettholder formuleringen minst på eller omtrent 80 % av den merkede LH-aktiviteten over en periode på 6 måneder ved en temperatur på eller omkring 1-10 °C, mer foretrukket på eller omkring 2-8 °C, mer foretrukket på eller omkring 4-5 °C. LH-aktivitet kan bli målt ved å benytte sødblårevektøknings-bioanalysen⁶.

Uttrykket "behandle" refererer til administreringen, oppfølgingen, håndtering og/eller omsorgen for en pasient for hvem LH-administrering er ønskelig for formålet av follikkel- eller testikkelstimulering eller enhver annen fysiologisk respons som reguleres av LH. Behandle kan slik inkludere, men er ikke begrenset til, administreringen av LH for induksjonen eller forbedringen av spermiekkvalitet, stimulering av testosteronfrigjøring hos mannen, eller follikkelutvikling eller for ovuleringsinduksjon hos kvinnen.

Uttrykket "flerdoseanvendelse" er ment å skulle inkludere anvendelsen av en enkelt ampulle, rør eller hylse med en LH-formulering til mer enn én injeksjon, for eksempel 2, 3, 4, 5, 6 eller flere injeksjoner. Injeksjonene blir fortrinnsvis gjort over en periode på minst på eller omtrent 12 timer, 24 timer, 48 timer o.s.v., fortrinnsvis opp til en periode på eller omkring 28 dager.

Injeksjonene kan være spredt i tid, for eksempel med en periode på 6, 12, 24, 48 eller 72 timer.

Et "salt" av et protein er et syre- eller baseaddisjonssalt. Slike salter blir fortrinnsvis dannet mellom enhver av eller flere av de ladde gruppene i proteinet og ethvert av eller flere av fysiologisk akseptable, ikke-toksiske kationer eller anioner. Organiske og uorganiske salter inkluderer for eksempel de som er fremstilt fra syrer slik som saltsyre, svovelsyre, sulfonsyre, vinsyre, fumarsyre, hydrobromsyre, glykolsyre,

sitronsyre, eplesyre, fosforsyre, ravsyre, eddiksyre, salpetersyre, benzosyre, askorbinsyre, p-toluensulfonsyre, benzensulfonsyre, naftalensulfonsyre, propionsyre, karbonsyre og liknende, eller for eksempel ammonium, natrium, kalium, kalsium eller magnesium.

- 5 Det har blitt funnet at en aminosyre som er valgt fra gruppen av arginin, lysin eller en blanding eller et salt derav er et passende stabiliserende middel for fremstilling av en stabil flytende formulering som omfatter LH. Derfor vedrører det første aspektet av oppfinnelsen en flytende gonadotropinformulering som inneholder luteiniserende hormon (LH) eller en variant derav, kjennetegnet ved at nevnte
10 formulering omfatter en stabiliserende mengde med arginin eller salter derav og/eller lysin eller salter derav.

Konsentrasjonen av arginin eller salter derav er på 10 mg/ml til 50 mg/ml, mer foretrukket på eller omtrent 20 mg/ml til på eller omtrent 40 mg/ml, mer foretrukket på eller omtrent 25 mg/ml til på eller omtrent 35 mg/ml, mest foretrukket på eller
15 omtrent 31,5 mg/ml.

Konsentrasjonen av lysin eller salter derav er på 10 mg/ml til 50 mg/ml, mer foretrukket på eller omtrent 20 mg/ml til på eller omtrent 40 mg/ml, mer spesielt foretrukket på eller omtrent 25 mg/ml til på eller omtrent 35 mg/ml, mest foretrukket på eller omtrent 28,5 mg/ml.

- 20 Det luteiniserende hormonet (LH) i den flytende formuleringen foreligger fortrinnsvis ved en konsentrasjon på eller omtrent 1 til på eller omtrent 50 µg/ml av den totale formuleringen.

I én utførelsesform foreligger det luteiniserende hormonet (LH) ved en konsentrasjon på eller omtrent 1 til 15 µg/ml av den totale formuleringen, spesielt
25 når den er ment for enkeltanvendelse.

I en ytterligere utførelsesform foreligger det luteiniserende hormonet (LH) ved en konsentrasjon på eller omtrent 15 til 30 µg/ml av den totale formuleringen, spesielt når den er ment for flere anvendelser (multidose).

- LH-konsentrasjonen i formuleringen er fortrinnsvis på eller omtrent 20 IU/ml til på
30 eller omtrent 2000 IU/ml, mer foretrukket på eller omtrent 50 til på eller omtrent 1000 IU/ml, mer spesielt foretrukket på eller omtrent 100 IU/ml til på eller omtrent 600 IU/ml.

Fortrinnsvis blir LH fremstilt rekombinant, spesielt foretrukket blir det fremstilt i kinesiske hamsterovarie (CHO) –celler som er transfektert med en
35 ekspresjonsvektor eller vektorer som omfatter DNA som koder for den humane glykoprotein- α -subenheten og β -subenheten for LH. DNA som koder for alfa- og beta-subenhetene kan foreligge på samme eller på forskjellige vektorer.

- Rekombinant LH har flere fordeler i forhold til sine motstykker fra urin. Dyrknings- og isoleringsteknikker som benytter rekombinante celler tillater konsistens mellom ladninger. I motsetning til dette varierer LH fra urin mye fra ladning til ladning ved slike karakteristika som renhet, glykosyleringsmønster, sialylering og oksidasjon av subenheter. På grunn av høyere konsistens og renhet fra ladning til ladning for rekombinant LH kan hormonene bli enkelt identifisert og kvantifisert ved å benytte teknikker slik som isoelektrisk fokusering(IEF). Enkelheten ved hvilken rekombinant LH kan bli identifisert og kvantifisert muliggjør fylling av rør ved masse med hormon (fylle etter masse) heller enn fylling ved bioanalyse.
- Fortrinnsvis har de flytende formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse en buffer, fortrinnsvis en fosfatbuffer, der foretrukne motioner er natrium- eller kaliumioner. Fosfatsaltløsningsbufferer er velkjente på fagområdet, slik som Dulbeccos fosfatbufrede saltløsning. Bufferkonsentrasjoner i total løsning kan variere mellom på eller omtrent 1 mM, 5 mM, 9,5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM og 500 mM. Fortrinnsvis er bufferkonsentrasjonen på eller omtrent 10 mM. Spesielt foretrukket er en buffer 10 mM i fosfationer med en pH på eller omtrent 8,0.
- Fortrinnsvis er bufferen justert på en slik måte at de flytende formuleringene ifølge oppfinnelsen har en pH mellom på eller omtrent 7,0 og på eller omtrent 9,0, mer foretrukket på eller omtrent 7,5 til på eller omtrent 8,5, inkludert omtrent pH 7,8, pH 8,0 og 8,2. Oppfinnelsen er rettet på flytende formuleringer av LH eller LH-variant som kan være enkeltdose eller flerdose.
- De flytende LH-formuleringene ifølge oppfinnelsen som er ment til flerdoseanvendelse omfatter et bakteriostatisk middel, slik som fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, klorcresol, benzylalkohol, alkylparaben (metyl, etyl, propyl, butyl og liknende), benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid, natriumdehydroacetat og timerosal. Foretrukket er benzylalkohol, fenol og kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid. Det bakteriostatiske middelet blir benyttet i en mengde som vil gi en konsentrasjon som er effektiv til å opprettholde formuleringen essensielt bakteriefri (passende for injeksjon) over flerdoseinjeksjonsperioden, som kan være på eller omtrent 12 eller 14 timer til på eller omtrent 12 eller 14 dager, fortrinnsvis på eller omtrent 6 til på eller omtrent 28 dager.
- Det bakteriostatiske middelet er fortrinnsvis til stede i en konsentrasjon på eller omtrent 0,005 til omtrent 15 mg/ml, mer foretrukket på eller omtrent 0,01 til på eller omtrent 12 mg/ml. Det bakteriostatiske middelet er fortrinnsvis til stede i en konsentrasjon på eller omtrent 0,1 % (masse bakteriostatisk middel/masse løsningsmiddel) til på eller omtrent 2,0 %, mer foretrukket på eller omtrent 0,2 % til på eller omtrent 1,0 %.
- I tilfellet med benzylalkohol er en konsentrasjon på 0,9 % eller 1,2 % spesielt foretrukket. I tilfellet med fenol er en konsentrasjon på 0,5 % spesielt foretrukket. I

tilfellet med kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid er en konsentrasjon på henholdsvis 0,3 % og 0,001 % spesielt foretrukket.

- 5 Fortrinnsvis inneholder formuleringene ifølge oppfinnelsen en antioksidant, slik som metionin, natriumbisulfitt, salter av etylendiamintetraeddiksyre (EDTA), butylert hydroksytoluen (BHT) og butylert hydroksyanisol (BHA). Mest foretrukket er metionin. Antioksidantene forhindrer oksidasjon av LH (spesielt α -subenheten).

Antioksidanten, for eksempel metionin er fortrinnsvis til stede i en konsentrasjon på eller omtrent 0,01 til på eller omtrent 5,0 mg/ml, mer foretrukket på eller omkring 0,05 til på eller omkring 0,5 mg/ml.

- 10 Fortrinnsvis inneholder formuleringene ifølge oppfinnelsen et overflateaktivt middel. Det overflateaktive middelet er fortrinnsvis valgt fra gruppen av polysorbater, spesielt Tween 20 (polyoksyetylen (20) sorbitanmonolaurat), Tween 40 (polyoksyetylen (20) sorbitanmonopalmitat) og Tween 80 (polyoksyetylen (20) sorbitanmonooleat). Mest foretrukket er Tween 20, fortrinnsvis ved en
15 konsentrasjon på eller omtrent 0,01 til på eller omtrent 10 mg/ml.

I en foretrukket utførelsesform omfatter formuleringene ifølge oppfinnelsen minst 25 $\mu\text{g/ml}$ med r-hLH, 1,65 mg/ml med $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,104 mg/ml med $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 31,5 mg/ml argininmonohydroklorid, 0,05 mg/ml Tween 20, 0,5 mg/ml metionin og 5 mg/ml fenol.

- 20 I en annen foretrukket utførelsesform omfatter formuleringene ifølge oppfinnelsen minst 25 $\mu\text{g/ml}$ med r-hLH, 1,65 mg/ml med $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,104 mg/ml med $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28,5 mg/ml lysinmonohydroklorid, 0,05 mg/ml Tween 20, 0,5 mg/ml metionin og 12 mg/ml benzylalkohol.

- 25 I en annen foretrukket utførelsesform omfatter formuleringene ifølge oppfinnelsen minst 25 $\mu\text{g/ml}$ med r-hLH, 1,65 mg/ml med $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,104 mg/ml med $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28,5 mg/ml lysinmonohydroklorid, 0,05 mg/ml Tween 20, 0,5 mg/ml metionin, 3 mg/ml benzylalkohol og 0,01 mg/ml benzalkoniumklorid.

- 30 I en foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et flytende farmasøytisk preparat for multidosseanvendelse som omfatter LH eller LH-variant, et stabiliserende middel valgt fra gruppen av arginin, lysin eller en blanding eller salt derav, og et bakteriostatisk middel valgt fra benzylalkohol, fenol, og en kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid.

- 35 I en ytterligere foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av et flytende farmasøytisk preparat, for multidosseanvendelse, som omfatter å danne en vandig løsning av LH eller LH-variant, et stabiliserende middel valgt fra gruppen av arginin, lysin eller en blanding eller salt derav, og et bakteriostatisk middel valgt fra benzylalkohol, fenol og en kombinasjon av benzylakohol og benzalkoniumklorid, og WFI (vann for injeksjon).

I nok en annen foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av et forpakket farmasøytisk preparat som omfatter utlevering av en løsning som omfatter LH eller LH-variant, et stabiliserende middel valgt fra gruppen av arginin, lysin eller en blanding eller et salt derav, og et

5 bakteriestatisk middel valgt fra benzylalkohol, fenol, og en kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid.

I nok en annen foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremstilt artikkel til human farmasøytisk anvendelse, som omfatter en løsning av LH eller LH-variant, et stabiliserende middel valgt fra gruppen av arginin, lysin eller en

10 blanding eller salt derav, og et bakteriestatisk middel valgt fra benzylalkohol, fenol, og en kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid, og en etikett som slår fast at en slik løsning kan bli holdt over en periode på eller omtrent tjuefire timer eller mer etter den første anvendelsen. Fortrinnsvis slår etiketten fast at løsningen kan bli holdt opp til eller omtrent 12 til 14 dager etter den første anvendelsen.

15 Før den første anvendelsen, det vil si før forseglingen på rørampullen eller hylsen har blitt brutt, så kan formuleringene ifølge oppfinnelsen bli holdt i minst eller omtrent 6 måneder, 12 måneder eller 24 måneder.

Ved foretrukne lagringsbetingelser, før den første anvendelsen, så blir formuleringene holdt vekk fra sterkt lys (fortrinnsvis i mørke) ved temperaturer på

20 eller omtrent 2-8 °C, mer foretrukket 4-5 °C.

Som bemerket ovenfor tilveiebringer oppfinnelsen flytende formuleringer av LH eller LH-variant for singel anvendelse eller multidosseanvendelse, inneholdende et bakteriestatisk middel. Formuleringene ifølge oppfinnelsen er hensiktsmessige for farmasøytisk eller veterinærmessig anvendelse.

25 Som bemerket ovenfor tilveiebringer oppfinnelsen i en foretrukket utførelsesform en fremstilt artikkel som omfatter forpakkingsmateriale og et rør inneholdende en løsning av LH eller LH-variant, et stabiliserende middel valgt fra gruppen av arginin, lysin eller en blanding eller salt derav, et bakteriestatisk middel valgt fra benzylalkohol, fenol, og en kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid,

30 eventuelt med buffere og/eller andre eksipienser, i et vandig fortynningsmiddel, der nevnte forpakkingsmateriale omfatter en etikett som indikerer at en slik løsning kan bli holdt over en periode på tjuefire timer eller mer etter den første anvendelsen.

Fortrinnsvis opprettholder formuleringene ifølge oppfinnelsen minst eller omtrent 80 % av LH-aktiviteten på forpakkningstidspunktet over en periode på 24 måneder

35 (før den første anvendelsen). LH-aktivitet kan bli målt ved å benytte rottesædblærevektøkningbioanalysen⁵.

Formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli fremstilt ved hjelp av en prosess som omfatter å blande LH eller en variant derav og en stabiliserende mengde med arginin eller salter derav og/eller lysin eller salter derav, og eventuelt

- et bakteriostatisk middel valgt fra benzylalkohol, fenol, og en kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid som faste stoffer eller løse opp LH eller en variant derav og en stabiliserende mengde av arginin eller salter derav og/eller lysin eller salter derav, og eventuelt et bakteriostatisk middel valgt fra benzylalkohol, fenol og en kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid i et vandig fortynningsmiddel. Blanding av komponentene og oppløsning av dem i et vandig fortynningsmiddel blir utført ved å benytte konvensjonelle oppløsnings- og blandeprosedyrer. For å fremstille en passende formulering blir for eksempel en utmålt mengde med LH eller LH-variant i bufret løsning kombinert med arginin eller salter derav og/eller lysin eller salter derav og eventuelt et bakteriostatisk middel valgt fra benzylalkohol, fenol, og en kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid i en bufret løsning i mengder som er tilstrekkelige til å tilveiebringe proteiner, arginin eller salter derav og/eller lysin eller salter derav og det eventuelle bakteriostatiske middelet ved de ønskede konsentrasjonene. Den resulterende løsningen blir deretter fordelt i rør, ampuller eller hylser. Variasjoner i denne prosessen vil være kjent for fagfolk på området. For eksempel er rekkefølgen komponentene blir tilsatt i, hvorvidt ytterligere tilsetningsstoffer blir benyttet, temperaturen og pH ved hvilken formuleringen blir klargjort, alle faktorer som kan bli optimalisert for konsentrasjonen og administreringsmiddelet som benyttes.
- I en foretrukket utførelsesform er formuleringene ifølge oppfinnelsen fremstilt ved å klargjøre individuelle stokkløsninger med kjent konsentrasjon av alle komponentene i formuleringen (for eksempel buffer natriumfosfat, arginin eller salter derav og/eller lysin eller salter derav, Tween 20, metionin, LH) og ta ut volumetriske mengder for å danne en "morløsning" av det samme preparatet som den endelige formuleringen. "Morløsningen" blir fortrinnsvis filtrert gjennom en Duropore® (Millipore) 0,22 mikron PDF-membran for å fjerne mikroorganismer, og deretter blir volumer fordelt i individuelle beholdere, slik som i rør, ampuller eller hylser.
- Formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli benyttet i kombinasjon med formuleringer som omfatter FSH eller FSH-variant (for eksempel Gonal-F®).
- Formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli administrert ved å benytte anerkjente innretninger, Eksempler som omfatter disse enkeltrørsystemene inkluderer penninjektorinnretninger for levering av en løsning slik som EasyJect®, Gonal-F® Pen, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen® og OptiPen®.
- Produktene som her er krevd inkluderer forpakkingsmateriale.
- Forpakkingsmaterialet tilveiebringer i tillegg til informasjonen som er pålagt fra regulatoriske myndigheter betingelsene ved hvilke produktet kan bli benyttet. For det enkelte røret med løsningsprodukt indikerer etiketten at en slik løsning kan bli lagret etter første anvendelse i en periode på tjuefire timer eller mer, fortrinnsvis i opp til 12 eller 14 dager. De herværende krevde produktene er nyttige til human farmasøytisk anvendelse.

De følgende eksemplene er tilveiebrakt kun for å ytterligere illustrere fremstillingen av formuleringene og preparatene ifølge oppfinnelsen. Omfanget av oppfinnelsen skal ikke bli ansett som kun å bestå av de følgende eksemplene.

5 Eksempler

Materialer

Artikkel	Produsent
r-hLH Bulk	Laboratoires Serono SA
L-Argininmonohydroklorid	Merck code 1.01544
Benzalkoniumklorid	Fluka code 12063
Benzylalkohol	Merck code 1.00987
m-Cresol	Merck code 8.09691
L-Glycin	Merck code 5.00190
L-Lysinmonohydroklorid	Merck code 1.05701
Metionin	Merck code 1.05707
Fenol	Merck code 1.00200
Orto-fosforsyre 85 % (Ph Eur, BP, NF)	Merck code 1.00563
Natriumhydroksid	Merc code 1.06498
di-Natriumhydrogenfosfatdihydrat	Merck code 1.06580
Natriumdihydrogenfosfatmonohydrat	Merck code 1.06346
Natriumsulfat vannfri	Merck code 1.006649
Sorbitol	Sigma code S-1876
Sakkarose	Merck code 1.07653
Trehalose	Merck code 1.08216
Tween 20	Merck code 8.22184
Vann	milliQ

Den følgende undersøkelsen evaluerte de følgende parametrene for et stort antall formuleringer:

- 10 - Undersøkelse av stabiliserende og/eller bakteriostatiske midler
- Kompatibilitet med FSH-formuleringer

- Kompatibilitet med primær forpakning
- Stabilitetsprofil etter lagring

5 Formuleringene var flytende monodose- og multidoseformuleringer. De følgende seks stabiliserende midlene ble evaluert:

- L-argininmonohydroklorid (ARG eller arginin i eksemplene)
- L-lysinmonohydroklorid (LYS eller lysin i eksemplene)
- Trehalose (TRE)
- L-glysin (GLY eller glysin i eksemplene)
- 10 - Sakkarose (SAC)
- Sorbitol (SOR)

De følgende fire bakteriostatiske midlene ble evaluert for multidoseformuleringene:

- Benzylalkohol (BA)
- 15 - m-cresol (mCr)
- Fenol (Phe)
- Kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid (BACL)

20 **Eksempel 1 – undersøkelse av stabiliserende midler for monodoseformuleringer**

Seks stabiliserende midler (sakkarose, arginin, glysin, sorbitol og trehalose) ble testet for å levere stabile monodoseformuleringer. De testede formuleringene er oppsummert i Tabell 1.

25 Tabell 1. Sammensetning av flere r-hLH-monodoseformuleringer inneholdende ulike stabiliserende midler.

Komponenter mengde/ml	SAC/250	ARG/250	GLY/250	LYS/250	SOR/250	TRE/250
r-hLH bulk	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg
Na ₂ HPO ₄ H 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
Metionin	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg

Tween 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Sakkarose	105 mg	-	-	-	-	-
Arginin	-	33 mg	-	-	-	-
Glysin	-	-	23 mg	-	-	-
Lysin	-	-	-	28 mg	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	56,5 mg	-
Trehalose	-	-	-	-	-	106 mg
WFI	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml

q.s. = tilstrekkelig mengde

- 5 Omtrent 40 ml av hver løsning ble klargjort, filtrert gjennom en membran på 0,22 µm i en rustfri stålbeholder på 22 ml, og lagret ved 2-8 °C, +25 °C og +40 °C i 15 ml plastikkør. Løsningene ble testet for proteininnhold (med SE-HPLC), oksiderte former (med SE-HPLC), aggregater (med SE-HPLC) og subenhetsdannelse (kvalitativt ved SE-HPLC) opp til 1 måned. Resultatene av det komplette panelet med tester som ble utført på dette settet med formuleringer er rapportert i Tabellene 2-5.

10

Tabell 2. Renhet ved SE-HPLC (lagringstemperatur: +40 °C)

Formulering	% heterodimerer			% frie subenheter			% aggregater		
	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= tid; d=dager

Tabell 3. Renhet ved SE-HPLC (lagringstemperatur: +25 °C)

Formulering	% heterodimerer			% frie subenheter			% aggregater		
	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=måned

Tabell 4. % oksiderte former ved SE-HPLC

Formulering	12 dager (+40 °C)	1 måned (+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. = ikke tilgjengelig

5

Tabell 5. r-hLH-innhold ved SE-HPLC

Formulering	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

Basert på disse resultatene ble sakkarose, lysin og arginin valgt som beste eksipienser for ytterligere undersøkelse for deres kompatibilitet med en økende mengde (250 µg/ml og 500 µg/ml) med metionin som antioksidant. Sammensetningen av de testede løsningene er rapportert i Tabell 6. Det bemerkes at disse løsningene har blitt klargjort ex novo.

10

Tabell 6. Sammensetning av r-hLH-monodoseformuleringer inneholdende de valgte stabiliserende midlene og ulik mengde med metionin.

Komponenter mengde/ml	SAC/250	ARG/250	LYS/250	SAC/500	ARG/500	LYS/500
r-hLH bulk	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg	6 µg
Na ₂ HPO ₄ H 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
Metionin	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
Tween 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Sakkarose	105 mg	-	-	105 mg	-	-
Arginin	-	33 mg	-	-	33 mg	-
Lysin	-	-	28 mg	-	-	28 mg
WFI	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml

- 5 Omtrent 100 ml av hver løsning ble klargjort, filtrert gjennom en membran på 0,22 µm i en rustfri stålbeholder på 22 ml, og fylt i 1 ml glassprøyter for også å teste kompatibiliteten mellom legemiddelstoffet og den endelige beholderen (1 ml glassprøyte + stempel). Sprøytene ble lagret ved 2-8 °C, +25 °C, +33 °C og +40 °C. Lagringstemperaturen på +33 °C ble introdusert for å ha et kompromiss mellom en for rask (+40 °C) og for treg (+25 °C) degraderingskinetikk. Løsningene ble testet for r-hLH-innhold (ved SE-HPLC), oksiderte former (ved RP-HPLC), aggregater (ved SE-HPLC) og subenhetdannelse (kvalitativt ved SE-HPLC) opp til 2-3 måneder. Resultatene av det komplette panelet med tester utført på formuleringene beskrevet i Tabell 6 er rapportert i Tabell 7 til 11.

15

Tabell 7. Renhet ved SE-HPLC (lagringstemperatur: +40 °C)

Formulering	% heterodimerer		% frie subenheter		% aggregater		% heterodimerer (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=uker

Tabell 8. Renhet ved SE-HPLC (lagringstemperatur: +33 °C)

Formulering	% heterodimerer					% frie subenheter				
	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
Formulering	% heterodimerer					% frie subenheter				
	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
Formulering	% aggregater									
	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					

5

Tabell 9. Renhet ved SE-HPLC (lagringstemperatur: +25 °C)

Formulering	% heterodimerer			% frie subenheter			% aggregater		
	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

10 Tabell 10. % oksiderte former ved RP-HPLC

Formulering	4 dager (+40 °C)	8 uker (+25 °C)	4 uker (+33 °C)	6 uker (+33 °C)
SAC/250	6,13	7,32	9,72	20,13
ARG/250	17,37	35,78	39,12	45,93
LYS/250	6,29	5,96	9,72	7,02
SAC/500	4,69	5,67	6,69	8,10

ARG/500	5,24	5,05	8,00	8,63
LYS/500	3,25	4,02	5,71	6,64

Tabell 11. r-hLH-innhold ved SE-HPLC

Formulering	T=0	T=4 dager (+40 °C)	T=8 uker (+25 °C)	T= 4 uker (+33 °C)	T=6 uker (+33 °C)	T= 8 uker (+33 °C)
SAC/250	5,03	3,09	5,09	5,31	4,74	n.a.
ARG/250	6,27	4,92	6,00	5,96	5,63	6,20
LYS/250	5,90	3,74	5,50	5,63	5,34	5,17
SAC/500	5,00	3,36	4,25	5,05	n.a.	n.a.
ARG/500	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

5

Basert på disse resultatene viste sakkarose en høyere kompatibilitet med 250 µg/ml med metionin, lysin med 500 µg/ml med metionin og arginin med begge konsentrasjoner med metionin.

10

Eksempel 2. Kompatibilitet for flytende r-hLH-monodoseformuleringer med flytende FSH-flerdoseformulering.

I lys av resultatene som er tilkjennegjort i eksempel 1 ble formuleringene beskrevet i tabell 6 blandet med en FSH-formulering (d.v.s. Gonal-F® flytende multidoseformulering) og testet etter 24 timer med kontakt ved 25 °C i overensstemmelse med fremgangsmåtene nedenfor:

- RP-HPLC for r-hFSH og r-hLH α -subenhet oksiderte former (i tabell 12 under % renhet er de ikke-oksiderte formene rapportert),
- SE-HPLC for aggregatkvantitering,
- RP-HPLC for titer av r-hFSH og r-hLH,
- r-hFSH og r-hLH in vivo-bioanalyse,
- SDS-PAGE for r-hFSH og r-hLH frie subenheter og aggregatkvantitering (data ikke rapportert),
- Visuell fremtoning.

25

Resultatene er vist i tabellene 12 til 14.

Tabell 12. Renhet ved RP-HPLC og % aggregater ved SE-HPLC

30

Formulering	% renhet		% aggregater	
	T=0	T=24 t	T=0	T=24 t
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

Tabell 13. FSH- og LH-innhold

Formulering	r-hFSH-innhold*		r-hLH-innhold [#]	
	T=0	T=24 t	T=0	T=24 t
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

5 *FSH teoretisk: 200 IU = 15,48 µg/ml; [#] LH teoretisk: 100 IU = 4 µg/ml

Tabell 14. Bioanalyse

Formulering	r-hFSH-aktivitet		r-hLH-aktivitet	
	T=0	T=24 t	T=0	T=24 t
SAC/250	174,60	183,70	108,00	109,00

- 10 Alle de testede monodoseformuleringene var kompatible med Gonal-F®-
flerdoseformuleringen siden det var:
- Ikke noe tap av FSH- og LH-innhold,
 - Ingen oksidering,
 - Ingen aggregering og dissosiering av frie subenheter (ved SDS-
15 PAGE),
 - Ikke noe tap av LH- og FSH-bioaktivitet.

Eksempel 3 – Stabilitetsundersøkelse av flytende monodoseformuleringer

20

På basis av resultatene i de tidligere eksemplene ble formuleringene beskrevet i tabell 6, bortsett fra de som inneholdt arginin, klargjort ved to ulike r-hLH-konsentrasjoner (6 µg/ml og 12 µg/ml), lagret ved 2-8 °C og +25 °C og testet i overensstemmelse med en streng stabilitetsplan og i overensstemmelse med de
25 følgende analytiske fremgangsmåtene:

- RP-HPLC for LH-innhold,
- RP-HPLC for oksiderte α-subenhetformer,

- SDS-PAGE for frie subenheter og aggregater,
- Bioanalyse,
- pH i løsning,
- Visuell fremtreden.

5

En statistisk analyse ble utført på resultatene for alle parametrene som ble identifisert som stabilitetsindikerende ved hjelp av programvaren Stabileo 1.1.

10 *r-hLH-konsentrasjon (ved RP-HPLC) ved lagring ved 2-8 °C og +25±2 °C*

Ikke noe statistisk signifikant tap av proteinkonsentrasjon ble observert for formuleringene etter 6 måneder lagring ved 2-8 °C uansett r-hLH-konsentrasjon (6 µg/ml og 12 µg/ml). En vanlig minskning på 0,4 µg/måned ble observert etter 6

15 måneders lagring ved 25±2 °C.

r-hLH-bioaktivitet (bioanalyse) ved lagring ved 2-8 °C og +25±2 °C

Ikke noe relevant tap av bioaktivitet ble observert for formuleringene etter 6 måneders lagring ved 2-8 °C og +25±2 °C uansett r-hLH-konsentrasjon (6 µg/ml og 12 µg/ml).

20

% subenheter og aggregater ved SDS-PAGE

Prosentandelen av aggregater ved SDS-PAGE forblir under 2 % for begge konsentrasjoner etter 6 måneders lagring ved 2-8 °C og +25±2 °C. Prosentandelen av subenheter ved SDS-PAGE forblir under 2 % for begge konsentrasjoner etter 6 måneders lagring ved 2-8 °C. En vanlig minskning på omtrent 5 % ble observert etter 6 måneders lagring ved 25±2 °C.

25

30

% oksiderte former ved RP-HPLC

En økning på omtrent 0,4 %/måned ble målt etter 6 måneders lagring ved 2-8 °C og en økning i området på 0,6-1,4 %/måned ved 25±2 °C.

35

pH og fremtreden

Ingen endringer i fremtreden (farge, klarhet, synlige partikler) og heller ingen endring i pH ble observert i løpet av fremstilling og ved lagring.

40

Eksempel 4 – Forenlighet for stabiliseringsmidler og bakteriostatisk midler for multidoseformuleringer.

Seks stabiliserende midler (sakkarose, arginin, glysin, lysin, sorbitol og trehalose) ble testet for kompatibilitet med bakteriostatiske midler for å levere stabile multidoseformuleringer. De testede formuleringene er oppsummert i tabell 15.

5

Tabell 15. Sammensetning av flere r-hLH-flerdoseformuleringer inneholdende ulike kombinasjoner av stabiliserende midler og bakteriostatiske midler.

Komponenter mengde/ml	SAC/250 BA	SAC/250 mCr	SAC/250 Phe	ARG/250 BA	ARG/250 mCr	ARG/250 Phe
r-hLH bulk	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Na ₂ HPO ₄ H 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
Metionin	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
Tween 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Sakkarose	105 mg	105 mg	105 mg	-	-	-
Arginin	-	-	-	33 mg	33 mg	33 mg
Benzylalkohol	0,90 %	-	-	0,90 %	-	-
m-cresol	-	0,30 %	-	-	0,30 %	-
fenol	-	-	0,50 %	-	-	0,50 %
WFI	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml
Komponenter mengde/ml	LYS/250 BA	LYS/250 mCr	LYS/250 Phe	SOR/250 BA	SOR/250 mCr	SOR/250 Phe
r-hLH bulk	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Na ₂ HPO ₄ H 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
Metionin	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
Tween 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Lysin	28 mg	28 mg	28 mg	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	56,5 mg	56,5 mg	56,5 mg
Benzylalkohol	0,90 %	-	-	0,90 %	-	-
m-cresol	-	0,30 %	-	-	0,30 %	-
fenol	-	-	0,50 %	-	-	0,50 %

WFI	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml
Komponenter mengde/ml	GLY/250 BA	GLY/250 mCr	GLY/250 Phe	TRE/250 BA	TRE/250 mCr	TRE/250 Phe
r-hLH bulk	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Na ₂ HPO ₄ H 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
Metionin	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg	250 µg
Tween 20	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Glysin	23 mg	23 mg	23 mg	-	-	-
Trehalose	-	-	-	106 mg	106 mg	106 mg
Benzylalkohol	0,90 %	-	-	0,90 %	-	-
m-cresol	-	0,30 %	-	-	0,30 %	-
fenol	-	-	0,50 %	-	-	0,50 %
WFI	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml

Omtrent 40 ml av hver løsning ble klargjort, filtrert gjennom en membran på 0,22 µm og lagret ved 2-8 °C, +25 °C og +40 °C i 15 ml plastikkør. Løsningene ble testet for proteininnhold (ved hjelp av størrelseseksklusions-HPLC, SE-HPLC, data ikke vist), oksiderte former (ved hjelp av reversfase-HPLC, RH-HPLC), aggregater (ved hjelp av SE-HPLC) og subenhetsdannelse (kvalitativt ved SE-HPLC) opp til 1 måned. Resultatene av det fullstendige panelet av tester utført på dette settet med formuleringer er rapportert i tabellene 16 til 18. Alle løsningene inneholdende m-cresol (mCr) ble opaliserende til og med straks etter fremstilling på grunn av en ikke-kompatibilitet mellom det bakteriostatiske middelet og det overflateaktive middelet (Tween 20).

Tabell 16. Renhet ved SE-HPLC (lagringstemperatur: +40 °C)

Formulering	% heterodimerer			% frie subenheter			% aggregater		
	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/mPhe	98,34	74,20	67,13	-	19,63	23,71	1,66	5,57	9,17
GLY250/mCr	97,95	96,54	86,76	-	9,55	n.a.	2,05	3,14	n.a.

GLY250/BA	96,08	59,58	41,59	-	37,82	56,45	3,92	2,61	1,97
GLY250/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
Formulering	% heterodimerer			% frie subenheter			% aggregater		
	T=0	T=1d	T=4d	T=0	T=1d	T=4d	T=0	T=1d	T=4d
LY/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/mPhe	97,91	72,68	56,73	-	26,18	42,26	2,09	1,16	1,01
SOR250/mCr	90,46	86,33	58,78	-	n.a.	18,87	9,55	13,68	22,36
GLY250/BA	94,08	62,71	45,27	-	64,17	47,22	5,93	3,13	7,52
GLY250/Phe	94,74	70,58	55,75	-	22,30	32,76	5,26	7,13	11,50
ARG/250/mCr	86,07	77,26	40,60	-	n.a.	20,87	13,93	22,74	38,53
ARG/250/BA	94,74	69,53	42,19	-	21,36	44,22	5,26	9,12	12,88
ARG/250/Phe	91,05	85,29	54,89	-	n.a.	24,28	8,95	14,72	20,83

Tabell 17. Renhet ved SE-HPLC (lagringstemperatur: +25 °C)

Formulering	% heterodimerer			% frie subenheter			% aggregater		
	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
GLY250/mCr	97,95	97,00	95,39	-	-	-	2,05	3,00	4,62
GLY250/BA	96,08	97,63	68,21	-	-	28,42	3,92	2,37	2,17
GLY250/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
LY/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
SOR250/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

Tabell 18. % oksiderte former ved RP-HPLC

Formulering	12 dager (+40 °C)	1 måned (+25 °C)
SAC/250/mCr	51,14	16,62
SAC/250/BA	14,07	8,83
SAC/250/Phe	25,55	17,54
GLY250/mCr	59,29	5,43
GLY250/BA	10,53	4,44
GLY250/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
LY/250/mCr	44,05	16,36
LYS/250/BA	13,69	9,30
LYS/250/Phe	56,55	17,86
SOR250/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

Basert på disse resultatene ble sakkarose, lysin og arginin valgt som de beste stabiliserende midlene for å bli ytterligere undersøkt for deres forenlighet med en økt mengde metionin (500 µg/ml). Benzylalkohol, fenol og en kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid ble valgt som bakteriostatiske midler. De

10

Tabell 19. Sammensetning av flere r-hLH-flerdoseformuleringer inneholdende de valgte stabiliserende midlene og ulike bakteriostatiske midler.

Komponenter mengde/ml	SAC/500 BA	SAC/5000 BACL	SAC/500 Phe	ARG/500 BA	ARG/500 BACL	ARG/500 Phe
r-hLH bulk	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
Metionin	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
Sakkarose	105 mg	105 mg	105 mg	-	-	-
Arginin	-	-	-	33 mg	33 mg	33 mg
Benzylalkohol	1,2 %	0,30 %	-	1,2 %	0,30 %	-
Benzalkoniumklorid	-	0,001 %	-	-	0,001 %	-
fenol	-	-	0,50 %	-	-	0,50 %
WFI	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml	q.s. til 1 ml
Komponenter mengde/ml	LYS/500/BA		LYS/500/BACL		LYS/500/Phe	
r-hLH bulk	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	
Metionin	500 µg		500 µg		500 µg	
Tween 20	50 µg		50 µg		50 µg	
Lysin	28 mg		28 mg		28 mg	
Benzylalkohol	1,2 %		0,30 %		-	
Benzalkoniumklorid	-		0,001 %		-	
fenol	-		-		0,50 %	
WFI	q.s. til 1 ml		q.s. til 1 ml		q.s. til 1 ml	

Omtrent 100 ml av hver løsning ble klargjort, filtrert gjennom en membran på 0,22 µm og fylt i 3 ml hylser. Den følgende primære forpakningen ble benyttet:

- 3 ml glasshylser (Nuova Ompi) silkonisert
- Crimp caps vode CAP J 3ML L1H075-1-H1B FM 257/2 (Helvoet Pharma)
- Belagte stempler: Helvoet V9282 FM257/2 Omniflex-belagte.

Hylsene ble lagret ved 2-8 °C, +25 °C og +40 °C for å bli testet for proteininnhold (ved SE-HPLC), oksiderte former (ved RH-HPLC), aggregater (ved SE-HPLC) og subenhetdannelse (kvalitativt, ved SE-HPLC) opp til 2 måneder.

Resultatene av hele panelet med tester benyttet på dette andre settet med formuleringer er rapportert i tabellene 20 til 26.

Tabell 20. Renhet ved SE-HPLC (lagringstemperatur: +40 °C)

Formulering	% heterodimerer		% frie subenheter		% aggregater	
	T=0	T=3 dager	T=0	T=3 dager	T=0	T=3 dager
SAC/500/BA	100,00	60,01	-	39,55	-	0,44
SAC/500/BACL	100,00	67,31	-	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

5

Tabell 21. Renhet ved SE-HPLC (lagringstemperatur: +33 °C)

Formulering	% heterodimerer				% frie subenheter			% aggregater	
	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

10

Tabell 22. Renhet ved SE-HPLC (lagringstemperatur: +25 °C)

Formulering	% heterodimerer			% frie subenheter		% aggregater
	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

Tabell 23. % oksiderte former ved RP-HPLC (lagringstemperatur: +33 °C)

Formulering	T=0	T=3 uker	T=8 uker	T=13 uker
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

5

Tabell 24. % oksiderte former ved RP-HPLC (lagringstemperatur: +25 °C)

Formulering	T=0	T=4 uker	T=8 uker	T=13 uker
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

10 Tabell 25. % oksiderte former ved RP-HPLC

Formulering	T=0	T=13 uker (+5 °C)	T=0	T=3 dager (+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

Tabell 26. r-hLH-innhold ved SE-HPLC

Formulering	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

- 5 Disse resultatene bekreftet forenligheten for de stabiliserende midlene med en økt mengde metionin (se eksempel 1). I tillegg viste resultatene at de bakteriostatiske midlene er forenlige med 500 µg/ml med metionin.

10 **Eksempel 5 – Forenlighet for flytende r-hLH-flerdoseformuleringer med flytende FSH-flerdoseformulering**

Basert på resultatene i eksempel 4 ble formuleringer av r-hLH i 3 hylser blandet med en FSH-formulering (d.v.s. Gonal-F flytende flerdoseformulering) og testet etter 24 timer i kontakt ved 25 °C i overensstemmelse med fremgangsmåtene

15 nedenfor:

- SE-HPLC for renhet,
- RP-HPLC for r-hFSH- og r-hLH-titer,
- RP-HPLC for r-hFSH- og r-hLH- α -subenhet oksiderte former,
- r-hFSH- og r-hLH-in vivo bioanalyse,
- 20 - SDS-PAGE for kvantifisering av r-hFSH- og r-hLH-frie subenheter og aggregater,
- pH i løsning,
- synlig fremtoning.

25 Resultatene er rapportert i tabellene 27 til 29.

Tabell 27. Renhet ved SE-HPLC

Formulering	% heterodimerer		% aggregater	
	T=0	T=24 t	T=0	T=24 t
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

5 Tabell 28. FSH- og LH-innhold

Formulering	r-hFSH-innhold*		r-hLH-innhold [#]	
	T=0	T=24 t	T=0	T=24 t
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 teoretisk: 200 IU=30,96 µg/ml, [#]LH teoretisk: 100 IU=8 µg/ml

Tabell 29. Bioanalyse

10

Formulering	r-hFSH-aktivitet		r-hLH-aktivitet	
	T=0	T=24 t	T=0	T=24 t
SAC/500/BACL	365,7	355,0	227,0	212,7
ARG/500/Phe	387,5	393,0	231,4	243

Alle testede flerdoseformuleringer er forenlige med Gonal-T-flerdoseformuleringen fordi det var:

- Ikke noe tap av FSH- og LH-innhold,
- Ingen oksidasjon,
- Ingen aggregering (ved SE-HPLC),
- Ingen aggregat- og subenhetsdannelse ved SDS-PAGE,
- Ikke noe tap av LH- og FSH-bioaktivitet.

20

Eksempel 6 – Forenlighet med primær forpakning

For å teste forenligheten mellom r-hLH-formuleringene og de endelige beholderne (sprøyter og hylser) ble en matriksundersøkelse satt opp for å teste de følgende parametrene:

- Effekt av r-hLH-konsentrasjon: 0,6 µg/ml, 12 µg/ml, 24 µg/ml,
- Effekt av fyllvolum: 0,25 ml, 0,5 ml, 1 ml,
- Type beholder: 1 ml glassprøyte og 3 ml glasshylse,
- Effekt av bakteriostatisk middel: formuleringer klargjort med og uten de bakteriostatiske midlene og lagret i 3 ml hylser.

En formulering (SAC/500/BACL) ble klargjort ved de ulike r-hLH-styrkene og fylt i beholderne ved ulike fyllvolumer. Ladningene ble sammenlignet kvalitativt ved SE-HPLC opp til 1 uke ved +33 °C. Resultatene er rapportert i figur 1 (A-F). I figur 2 (A-B) er prosentandelen av heterodimerer ved SE-HPLC på formuleringen med og uten kombinasjonen av bakteriostatiske midler sammenlignet. Ved å se på resultatene i figurene 1 og 2 kan de følgende konklusjonene trekkes:

- Ingen påvirkning av beholder på formuleringer ved 12 µg/ml og 24 µg/ml,
- Ingen påvirkning av fyllvolum på formuleringer ved 12 µg/ml og 24 µg/ml,
- Positiv effekt av økt konsentrasjon på dissosiering av subenheter,
- Ingen forskjell mellom ladninger med eller uten bakteriostatiske midler,
- Høyere stabilitet er relatert til høyere r-hLH-konsentrasjon.

Eksempel 7 – Stabilitetsundersøkelse av flytende flerdoseformuleringer

På grunnlaget av resultatene i de tidligere eksemplene ble fire formuleringer som er beskrevet i tabell 19 (SAC/500/BACL, LYS/500/BA, LYS/500/BACL og ARG/500/Phe) lagret ved 2-8 °C og +25 °C og testet i overensstemmelse med en streng stabilitetsplan og ifølge de følgende analytiske fremgangsmåtene:

- RP-HPLC for LH-innhold,
- RP-HPLC for oksiderte α-subenhetformer,
- RP-HPLC for fenolinnhold,
- RP-HPLC for benzalkoniumalkoholinnhold,
- RP-HPLC for benzylalkoholinnhold,
- SDS-PAGE for frie subenheter og aggregater,
- Bioanalyse,
- pH i løsning,

- Visuell fremtoning.

5 Lysin- og argininmengden i formuleringene ovenfor ble justert (d.v.s. L-lysinmonohydroklorid til 28,5 mg og L-argininmonohydroklorid til 31,5 mg) for å optimalisere isotonisiteten for formuleringene.

En statistisk analyse ble utført på resultatene for alle parametrene som ble identifisert som stabilitetsindikerende ved hjelp av Stabileo 1.1 programvare.

10 *r-hLH-konsentrasjon (ved RP-HPLC) ved lagring ved 2-8 °C og 25±2 °C*

Ingen statistisk signifikante tap i proteinkonsentrasjon ble observert for formuleringene etter 12 måneders lagring ved 2-8 °C. En vanlig minskning på 0,4 µg/måned ble observert etter 6 måneders lagring ved 25±2 °C.

15 *r-hLH-bioaktivitet (bioanalyse) ved lagring ved 2-8 °C og 25±2 °C.*

Ingen relevante tap i bioaktivitet ble observert for formuleringene etter 12 måneders lagring ved 2-8 °C og 25±2 °C.

20 *% subenheter og aggregater ved SDS-PAGE*

Prosentandelen av aggregater ved SDS-PAGE forblir under 2 % for alle formuleringer etter 12 måneders lagring ved 2-8 °C og 25 °C.

25 Prosentandelen av subenheter ved SDS-PAGE øker over 32 % etter 6 måneder ved 25 °C for alle formuleringer.

% oksiderte former ved RP-HPLC

30 SAC/500/BACL og ARG/500/Phe presenterer den lavere økningen av oksiderte former.

pH og fremtoning

35 Ingen endring i fremtoningen (farge, klarhet, synlige partikler) og heller ikke i pH ble observert under fremstilling og ved lagring.

Innhold av bakteriostatiske midler

40 Målmengdene av fenol og benzylalkohol ble påvist og ingen tap ble målt fra stabilitetssjekkpunkter ved 6 måneder til 12 måneder. En mengde av

benzalkoniumklorid under målet (6 µg/ml istedenfor 10 µg/ml) ble målt i SAC/500/BACL-formuleringen ved 6 måneders stabilitetssjekkpunktet.

Effektivitet av bakteriostatiske midler

5

Resultatene av de bakteriostatiske effektivitetstestene, utført ved T=0 og gjentatt etter 9 måneder på formuleringene er rapportert i tabellene 30 til 33.

10

Tabell 30. Resultater av bakteriostatisk effektivitetstest på flerdoseformulering SAC/500/BACL

Mikroorganisme	Log-reduksjon versus T=0				
	T=6 t	T=24 t	T=7 dager	T=14 dager	T=28 dager
Staphylococcus aureus	>3	>3	>3	>3	Ingen reduksjon
Pseudomonas aeruginosa	>3	>3	>3	>3	Ingen reduksjon
Escherichia coli	Ikke testet (nt)	nt	>3	>3	Ingen reduksjon
Candida albicans	nt	nt	>3	>3	Ingen reduksjon
Aspergillus niger	nt	nt	1,8	>3	Ingen reduksjon

15

Tabell 31. Resultater av bakteriostatisk effektivitetstest på flerdoseformulering LYS/500/BACL

Mikroorganisme	Log-reduksjon versus T=0				
	T=6 t	T=24 t	T=7 dager	T=14 dager	T=28 dager
Staphylococcus aureus	>3	>3	>3	>3	Ingen reduksjon
Pseudomonas aeruginosa	>3	>3	>3	>3	Ingen reduksjon
Escherichia coli	Ikke testet (nt)	nt	>3	>3	Ingen reduksjon
Candida albicans	nt	nt	>3	>3	Ingen reduksjon
Aspergillus niger	nt	nt	3,3	>3	Ingen reduksjon

Tabell 32. Resultater av bakteriostatisk effektivitetstest på flerdoseformulering LYS/500/BA

Mikroorganisme	Log-reduksjon versus T=0				
	T=6 t	T=24 t	T=7 dager	T=14 dager	T=28 dager
Staphylococcus aureus	1,05	>3	>3	>3	Ingen reduksjon
Pseudomonas aeruginosa	>3	>3	>3	>3	Ingen reduksjon
Escherichia coli	Ikke testet (nt)	nt	>3	>3	Ingen reduksjon
Candida albicans	nt	nt	>3	>3	Ingen reduksjon
Aspergillus niger	nt	nt	>3	>3	Ingen reduksjon

5

Tabell 33. Resultater av bakteriostatisk effektivitetstest på flerdoseformulering ARG/500/Phe

Mikroorganisme	Log-reduksjon versus T=0				
	T=6 t	T=24 t	T=7 dager	T=14 dager	T=28 dager
Staphylococcus aureus	0,73	>3	>3	>3	Ingen reduksjon
Pseudomonas aeruginosa	>3	>3	>3	>3	Ingen reduksjon
Escherichia coli	Ikke testet (nt)	nt	>3	>3	Ingen reduksjon
Candida albicans	nt	nt	>3	>3	Ingen reduksjon
Aspergillus niger	nt	nt	>3	>3	Ingen reduksjon

- 10 Formuleringene inneholdende kombinasjonen av 0,3 % benzylalkohol + 0,001 % benzalkoniumklorid, og sakkarose eller lysin (SAC/500/BACL og LYS/500/BACL) oppfylte kriterium A i the European Pharmacopeia selv om mengden av benzalkoniumklorid var lavere enn målet (6 µg/ml istedenfor 10 µg/ml). Formuleringen inneholdende 0,5 % fenol (ARG/500/Phe) og formuleringen
- 15 inneholdende 1,2 % benzylalkohol (LYS/500/BA) oppfylte kriterium B i the European Pharmacopeia.

Konklusjoner

- 20 Alle flerdoseformuleringer viste en god stabilitetsprofil etter 12 måneders lagring ved 2-8 °C.

Referanser:

Burgues *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(5): 980-6

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

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

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

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

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

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

Keutmann *et al.*; Structure of human luteinizing hormone beta subunit: evidence for related carboxyl-terminal sequence among certain peptide hormones; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **1979**, 90(3): 842-848

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EP 0 211 894

EP 0 448 146

EP 0 487 512

EP 0 505 500

EP 0 618 808

EP 0 814 841

EP 0 853 945

WO 85/01958

WO 98/58957

WO 00/04913

WO 01/58493

WO 2004/087213

WO 2004/105788

WO 2004/112826

US 3,119,740

US 5,767,067

PATENTKRAV

1. Flytende formulering inneholdende luteiniserende hormon (LH) eller en variant derav, karakterisert ved at nevnte formulering omfatter en fosfatbuffer og en stabiliserende mengde arginin eller salter derav ved en konsentrasjon på 10 til 50 mg/ml og/eller lysin eller salter derav ved en konsentrasjon på 10 til 50 mg/ml.
2. Formulering ifølge krav 1, der det luteiniserende hormonet (LH) er humant luteiniserende hormon (hLH).
3. Formulering ifølge krav 1 eller 2, der det luteiniserende hormonet (LH) er rekombinant humant luteiniserende hormon (r-hLH).
4. Formulering ifølge krav 1 eller 2, der det luteiniserende hormonet (LH) er urinært humant luteiniserende hormon (u-hLH).
5. Formulering ifølge ethvert av de foregående krav, der det luteiniserende hormonet (LH) foreligger ved en konsentrasjon på eller omtrent 1 til på eller omtrent 50 µg/ml.
6. Formulering ifølge ethvert av de foregående krav, der fosfatbufferen foreligger ved en konsentrasjon på 1 til 100 mM.
7. Formulering ifølge ethvert av de foregående krav, der fosfatbufferen fortrinnsvis er natriumfosfatbuffer.
8. Formulering ifølge ethvert av de foregående krav, som ytterligere omfatter et overflateaktivt middel.
9. Formulering ifølge krav 8, der det overflateaktive middelet er Polysorbat 20.
10. Formulering ifølge krav 9, der Polysorbat 20 foreligger ved en konsentrasjon på 0,01 til 10 mg/ml.

11. Formulering ifølge ethvert av de foregående krav, som ytterligere omfatter metionin.
- 5 12. Formulering ifølge krav 11, der metionin er til stede ved en konsentrasjon på 0,01 til 5,0 mg/ml.
13. Formulering ifølge ethvert av de foregående krav, som ytterligere omfatter et bakteriostatisk middel.
- 10 14. Formulering ifølge krav 13, der det bakteriostatiske middelet er valgt fra enhver av benzylalkohol, fenol og en kombinasjon av benzylalkohol og benzalkoniumklorid.
- 15 15. Formulering ifølge krav 13 eller 14, der det bakteriostatiske middelet foreligger ved en konsentrasjon på 0,005 til 15 mg/ml.
16. Formulering ifølge ethvert av de foregående krav, som ytterligere omfatter vann for injeksjon.
- 20 17. Formulering ifølge ethvert av de foregående krav, som har en pH i området på 7,5 til 8,5.
- 25 18. Formulering ifølge ethvert av de foregående krav, som omfatter minst 25 µg/ml r-hLH, 1,65 mg/ml Na₂HPO₄ 2H₂O, 0,104 mg/ml NaH₂PO₄ H₂O, 31,5 mg/ml L-argininmonohydroklorid, 0,05 mg/ml Tween 20, 0,5 mg/ml metionin og 5 mg/ml fenol.
- 30 19. Formulering ifølge ethvert av kravene 1 til 17, som omfatter minst 25 µg/ml r-hLH, 1,65 mg/ml Na₂HPO₄ 2H₂O, 0,104 mg/ml NaH₂PO₄ H₂O, 28,5 mg/ml lysinmonohydroklorid, 0,05 mg/ml Tween 20, 0,5 mg/ml metionin og 12 mg/ml benzylalkohol.
- 35 20. Formulering ifølge ethvert av kravene 1 til 17, som omfatter minst 25 µg/ml med r-hLH, 1,65 mg/ml Na₂HPO₄ 2H₂O, 0,104 mg/ml NaH₂PO₄ H₂O, 28,5 mg/ml

lysinmonohydroklorid, 0,05 mg/ml Tween 20, 0,5 mg/ml metionin, 3 mg/ml benzylalkohol og 0,01 mg/ml benzalkoniumklorid.

- 5 21. Farmasøytisk preparat som omfatter formuleringen ifølge ethvert av kravene 1 til 20.
22. Form for presentasjon av formuleringen ifølge ethvert av kravene 1 til 20 som er hermetisk forseglet under sterile betingelser i en beholder som er hensiktsmessig for lagring før bruk.
- 10 23. Fremgangsmåte for fremstilling av formuleringen ifølge ethvert av kravene 1 til 20, som omfatter fortynningen av det luteiniserende hormonet (LH) med en løsning av eksipienser.
- 15 24. Anvendelse av formuleringen ifølge ethvert av kravene 1 til 20 for fremstillingen av et medikament.
- 20 25. Anvendelse av formuleringen ifølge ethvert av kravene 1 til 20 for fremstillingen av et medikament for behandlingen av infertilitet hos kvinner og/eller menn.
- 25 26. Anvendelse av formuleringen ifølge ethvert av kravene 1 til 20 i kombinasjon med en flytende formulering som omfatter follikkelstimulerende hormon (FSH) eller en variant derav.
27. Formulering ifølge ethvert av kravene 1 til 20 for behandlingen av infertilitet hos kvinner og/eller menn.

Figur 1

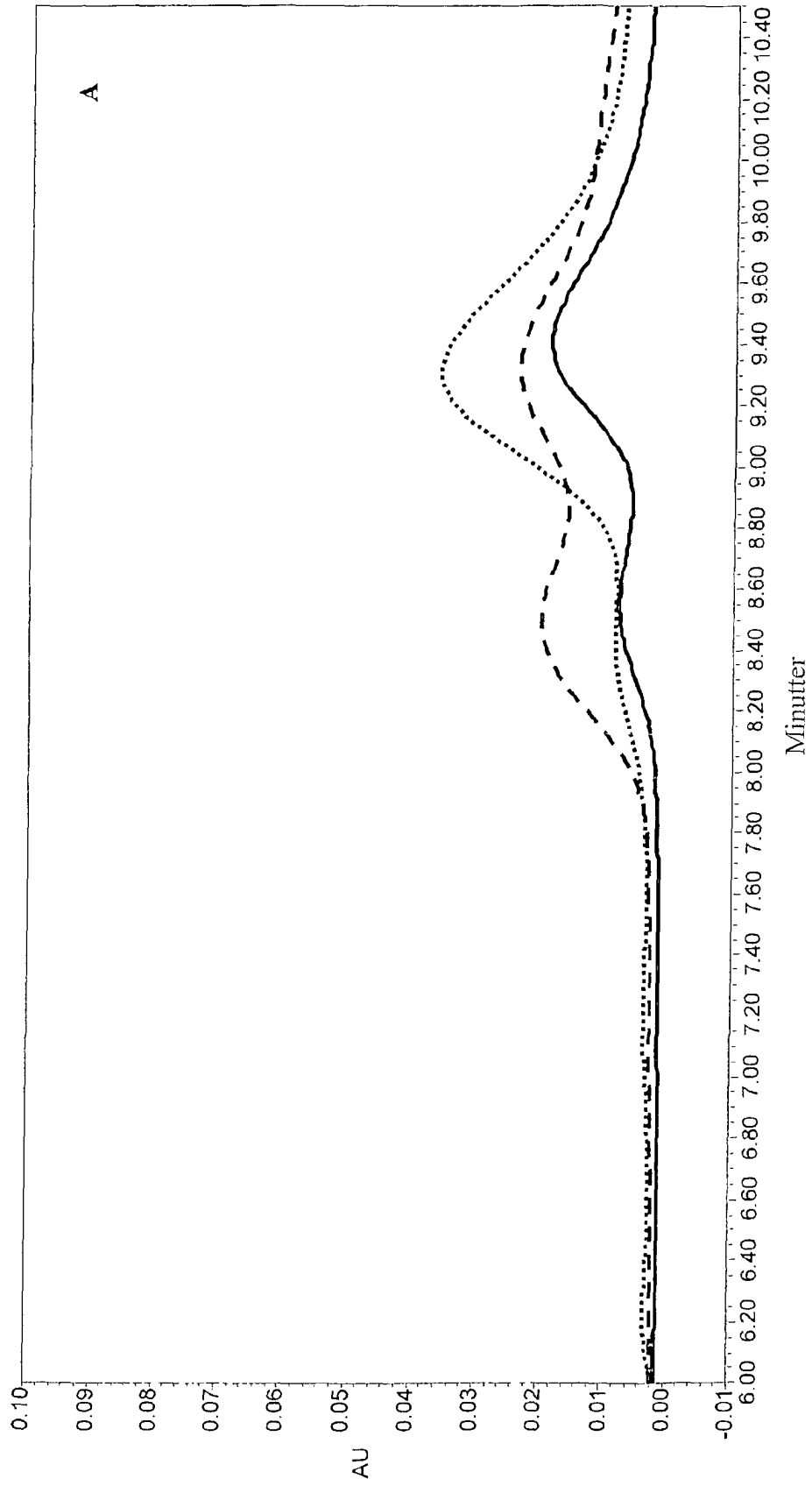


Fig. 1 forts.

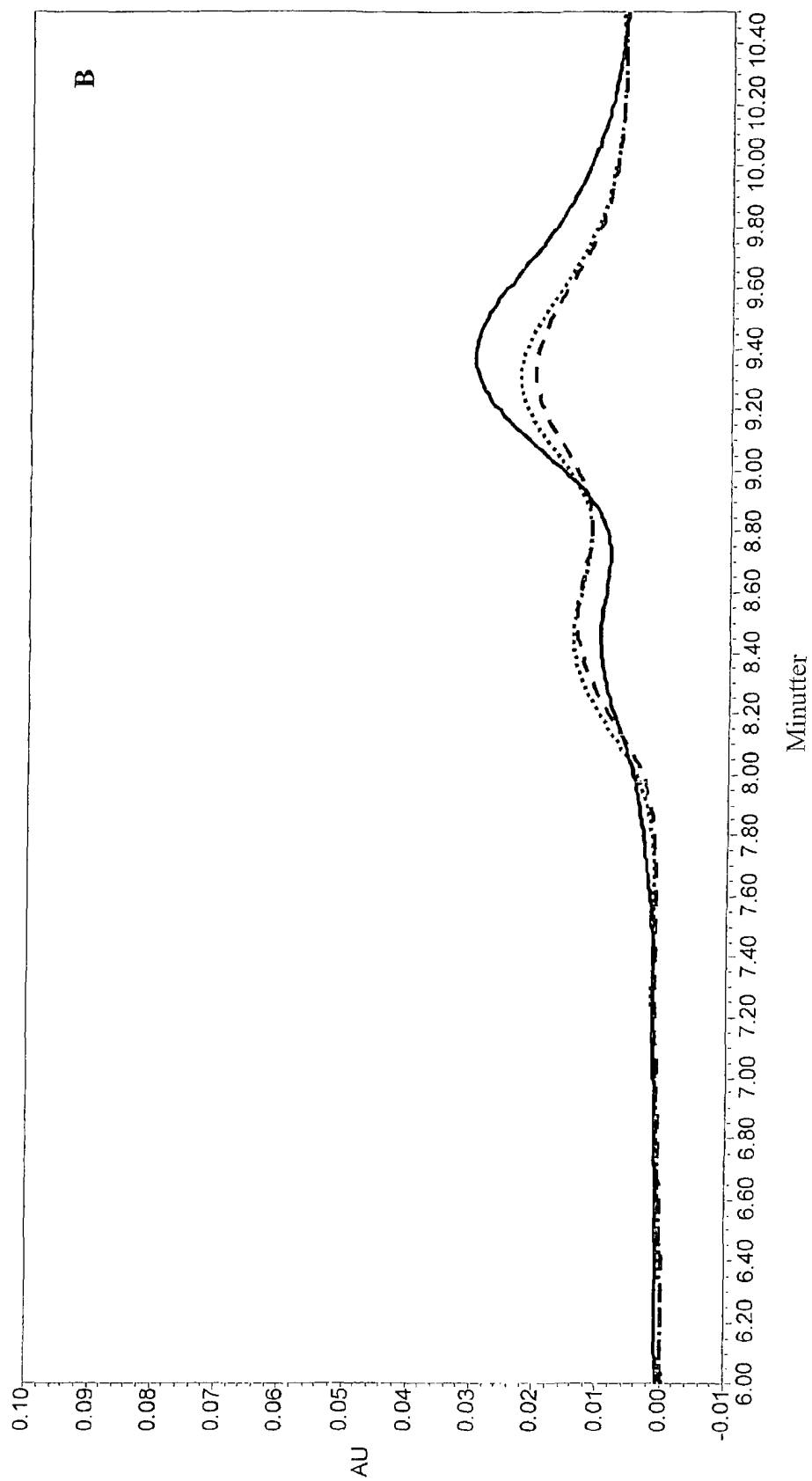


Figure 1 – Cont.

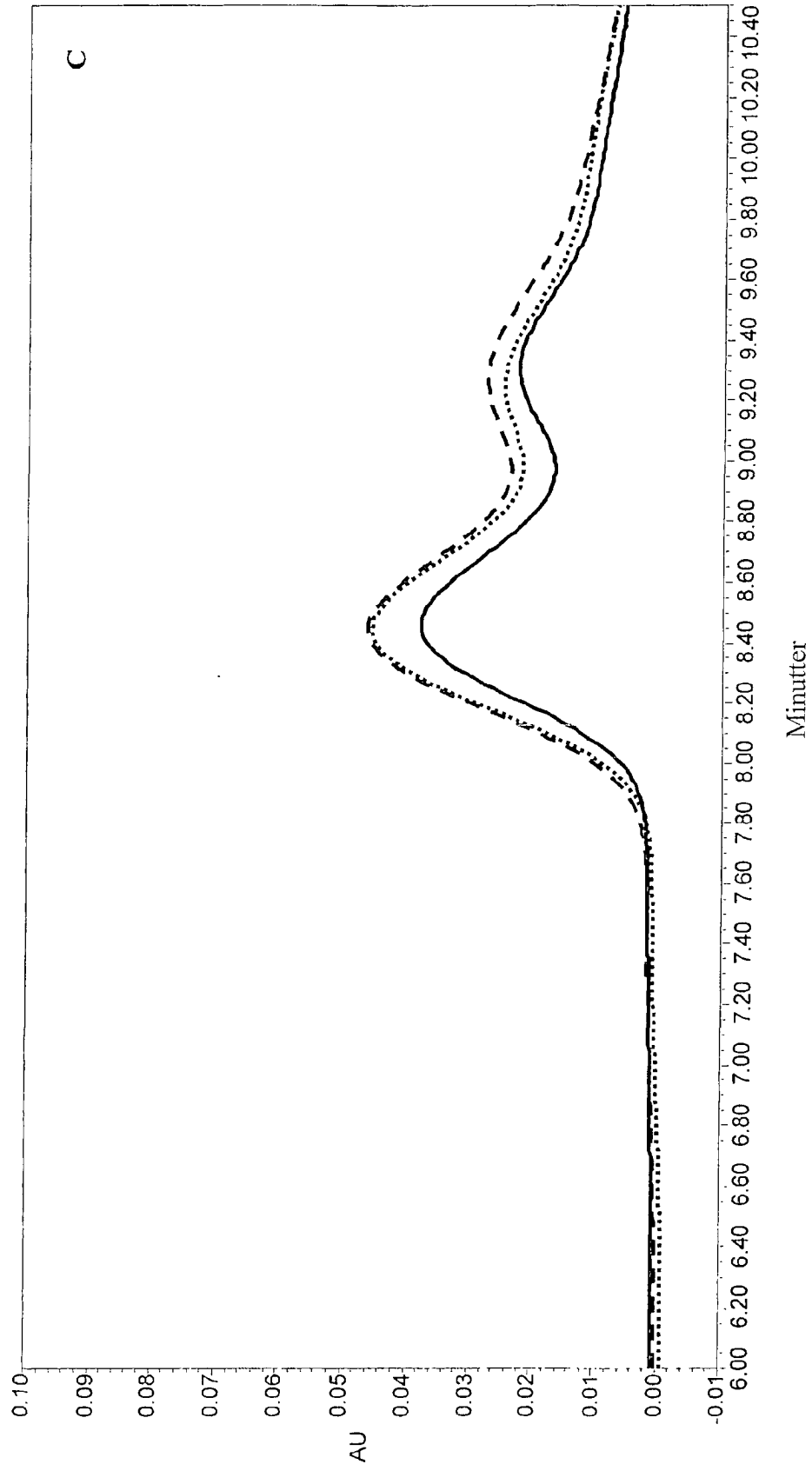


Fig. 1 forts.

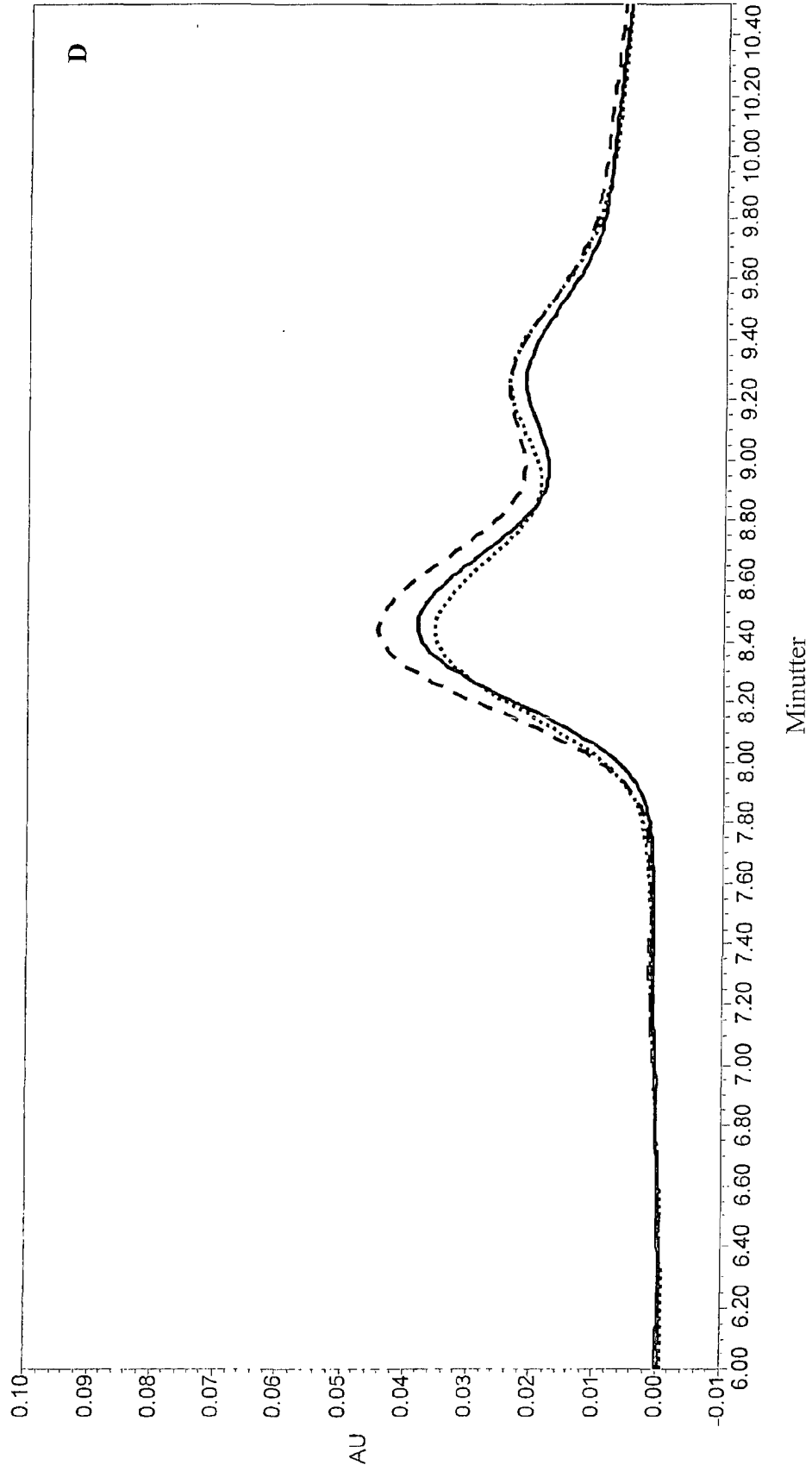


Fig. 1 forts.

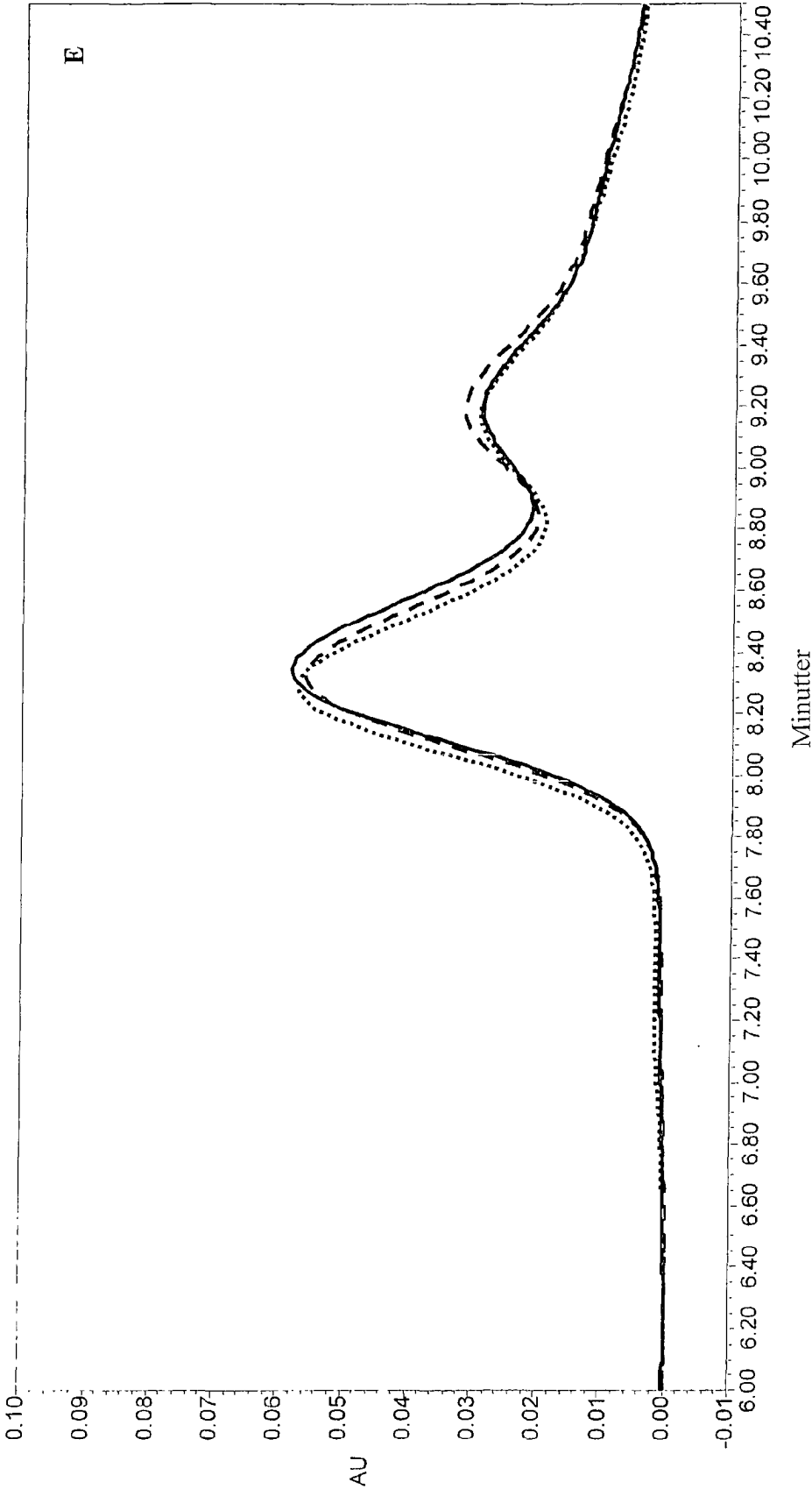
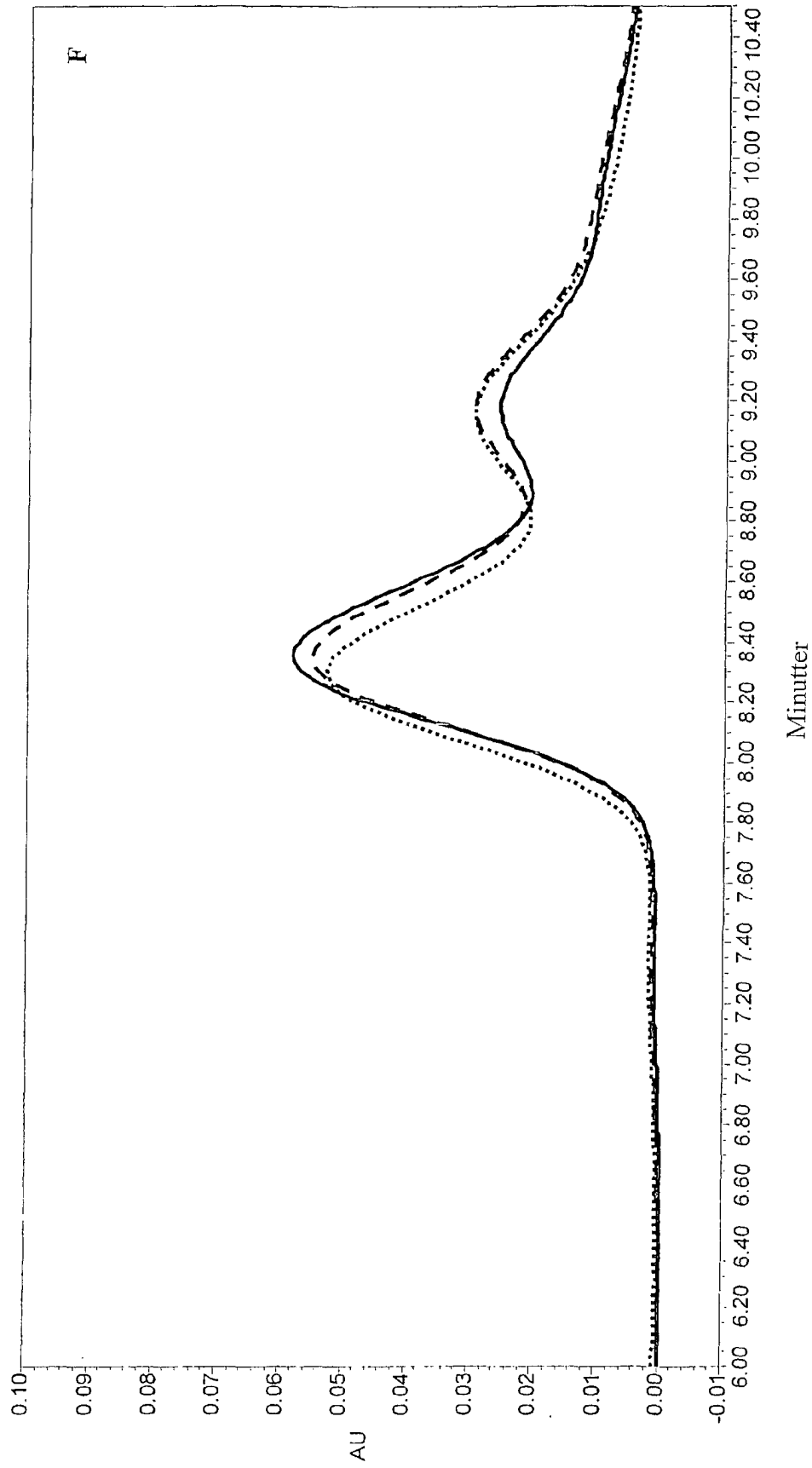


Fig. 1 forts.



Figur 2

