



MEMÓRIA DESCRITIVA

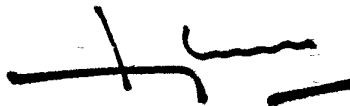
Resumo

É proporcionado um artigo moldado adaptado para implantação parentérica, para se obter uma administração prolongada de uma somatotropina a um animal compreendendo uma dose eficaz de uma somatotropina sólida, apresentando-se o referido artigo essencialmente livre de agente de ligação, essencialmente livre de matriz e tendo pelo menos uma superfície de libertação não revestida. O artigo pode conter também um lubrificante. A somatotropina é, normalmente, uma somatotropina expressa microbianamente e pode

=====

MONSANTO COMPANY

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ARTIGO MOLDADO PARA A ADMINISTRAÇÃO PROLONGADA DE UMA SOMATOTROPINA"



-2-

estar associada com cobre. E também referido o método de administração prolongada de somatotropina a um animal por implantação parentérica do referido artigo moldado.

Libertação Prolongada de Somatotropina

Trata-se de uma continuação em parte do Requerimento da Série Nº. 26.095, copendente, registrada em 16 de Março, 1987.

Este invento relaciona-se com a libertação prolongada de somatotropinas, mais particularmente com artigos moldados apropriados para administração parentérica de somatotropinas, e com métodos para a administração de somatotropinas por implantação parentérica desses artigos moldados.

Fundamentos do Invento

Sabe-se que as somatotropinas são eficazes para melhorar o crescimento, a eficácia alimentar, a produção do leite, e a relação gordura-carne magra de vários animais, quando administrados parentéricamente para aumentar o nível da somatotropina normalmente produzida pelo animal. Embora estes objectivos possam por vezes ser alcançados com injeções diárias de somatotropina, os sistemas de libertação prolongada são mais fáceis de administrar, e por vezes dão origem a resultados superiores devido a uma concentração sanguínea mais constante.

Foi usada nas técnicas anteriores uma série de métodos para se conseguir uma libertação aumentada das somatotropinas. A somatotropina tem sido dispersa num óleo biocompatível, facultativamente na presença de um agente de anti-hidratação (ver Publicação do Pedido da Paten-

te Europeia Nº. 177.478, publicada em 9 de Abril, 1986). A somatotropina tem sido transformada num complexo com um polímero hidrato de carbono solúvel na água ou dispersível na água, tal como dextrina, e várias gomas de feijão. Este complexo é administrado parentéricamente sob a forma de uma solução, dispersão ou pasta (ver Requerimento de Patente Europeia Nº 193.197 publicado em 10 de Setembro, 1986). A somatotropina também tem sido formulada com colesterol e comprimida para formar um implante matriz (ver Patente dos E.U.A. Nº. 4.452.775, por Kent, publicada em 5 de Junho, 1984).

E conhecido um grande número de sistemas para implantação parentérica de artigos para a libertação de uma série de materiais bioactivos. E conhecida nesta técnica uma ampla variedade de agentes de ligação e de agentes de matriz para utilização juntamente com materiais bioactivos para produzir artigos para implantação parentérica. De um modo semelhante, é também conhecida a implantação de artigos revestidos em que a libertação de um material bioactivo da parte central é regulada pela difusão através de ou pela erosão de um revestimento polimérico. Estes sistemas da técnica anterior possuem uma coisa em comum. Em cada um deles a libertação da substância activa é regulada pelo agente de matriz, pelo agente de ligação ou pelo revestimento. A libertação é realizada por transferência através de ou por erosão do agente de matriz, agente de ligação ou de revestimento. A libertação prolongada de somatropinas seguiu um modelo semelhante, em que a dissolução da somatropina activa é inibida por uma outra substância e a libertação é regulada por essa outra substância.

O presente invento proporciona a administração parentérica de uma somatotropina sem a necessidade de outra substância para controlar a libertação da somatotropina. Antes deste invento, não se sabia, na técnica anterior, administrar uma somatotropina sob a forma de um artigo moldado que se apresenta substancialmente livre de matriz,

substancialmente livre de agente de ligação, e com pelo menos uma superfície de libertação não revestida.

Resumo do Invento

Este invento proporciona um novo e útil sistema de fornecimento para administração parentérica, de uma somatotropina a um animal, por implantação parentérica de um artigo moldado compreendendo uma dose eficaz de uma somatotropina sólida, a qual se apresenta essencialmente livre de agente de ligação, essencialmente livre de matriz, e que tem pelo menos uma superfície de libertação não revestida. Num outro aspecto, o presente invento é um artigo moldado para administração parentérica de uma somatotropina a um animal, consistindo essencialmente numa somatotropina sólida, facultativamente numa quantidade eficaz de um agente de lubrificação e facultativamente num revestimento numa ou mais superfícies, mas com pelo menos uma superfície de libertação não revestida. Tal como é aqui usada a frase "consistindo essencialmente em" significa que o artigo não contém quaisquer componentes que actuem como um agente de matriz ou como um agente de ligação, tal como cada uma destas expressões é definida a seguir. O presente invento também proporciona um método para a administração de uma somatotropina por implantação parentérica deste artigos moldados.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 representa gráficamente a produção de leite por vacas tratadas e de controlo (testemunhas) no Exemplo 2.

A Figura 2 representa gráficamente a concentração da somatotropina no soro de vacas tratadas e de controlo (testemunhas) no Exemplo 2.

A Figura 3 representa gráficamente a concentração da somatotropina do soro de vacas não leiteiras tratadas com MBS no Exemplo 3.

Descrição Detalhada do Invento

Tal como são usadas na apresentação detalhada e nas reivindicações, as palavras que se seguem têm os significados que se seguem:

A expressão "matriz" significa um veículo de fase sólida, também referido como "agente de matriz", o qual forma uma rede no interior da qual são dispersas as partículas de somatotropina inibindo-se desse modo a dissolução da somatotropina. A libertação da somatotropina é regulada pela erosão do agente matriz ou pela difusão da somatotropina através de passagens na rede do agente matriz.

A expressão "agente de ligação" refere-se a materiais poliméricos, de origem quer sintética quer biológica, os quais são usados para aumentar a adesão

entre as particulas da somatotropina, ou entre particulas da somatotropina e um agente matriz.

As frases "essencialmente livre de agente de ligação" e "essencialmente livre de matriz" significam que o artigo moldado não contem uma quantidade suficiente de agente de ligação ou de agente matriz para produzir um efeito substancial sobre a libertação da somatotropina.

A frase "pelo menos uma superfície de libertação não revestida" significa que pelo menos uma porção da superfície do artigo não apresenta um revestimento que iniba materialmente a libertação da somatotropina. A superfície de libertação não revestida pode ser constituída por uma face inteira do artigo, por exemplo uma ou ambas as extremidades de um artigo cilíndrico, ou pode ser constituída por uma área não revestida de uma superfície maior do artigo, por exemplo uma ou mais áreas não revestidas sobre um artigo esférico, ou uma ou mais áreas não revestidas sobre a superfície curva de um artigo cilíndrico.

A expressão "somatotropina" significa um polipeptido que tem uma actividade biológica e uma estrutura química semelhantes às da somatotropina produzida na glandula pituitária de um animal. Essa somatotropina inclui somatotropina natural produzida por células somatotrópicas da pituitária, e alternativamente, somatotropina produzida por meio de técnicas de ADN recombinante por meio das quais a somatotropina é expressa por células transformadas geneticamente. Os sistemas apropriados incluem cultura de tecidos de células de tecidos transformados, e expressão por micróbios (micoorganismos) transformados tais com E. Coli, outras bactérias, levedura, etc. Tendo em conta aspectos da produção é preferido usar somatotropina expressa microbianamente. Essa somatotropina produzida por ADN recombinante pode possuir uma sequência de amino ácidos idêntica à de uma somatotropina que

ocorra naturalmente assim como à de variantes em que os resíduos de amino ácidos ou são adicionados a, subtraídos a ou são diferentes da sequência de amino ácidos da somatotropina que ocorre naturalmente, contanto que essas adições, eliminações ou alterações na sequência de amino ácidos não afectem com um prejuízo intolerável a bioactividade da somatotropina. São também incluídas as somatotropinas que são sais ou complexos com aniões ou catiões. Estes complexos podem ser co-precipitados ou liofilizados na presença de um composto inorgânico ou orgânico, tal como um sal, para formar uma mistura íntima ou podem ser formados humidificando uma mistura seca da somatotropina e de um composto contendo o ião desejado. São também incluídas as misturas de somatotropinas ou somatotropinas com camadas múltiplas.

Exemplos de somatotropinas úteis no presente invento incluem somatotropina de aves para o tratamento de aves para o tratamento de galinhas, perús, etc.; somatotropinas de mamíferos para o tratamento de seres humanos, de gado bovino, de porcos, carneiros, cabras, etc.; e somatotropina aquática para o tratamento de peixes, etc. São particularmente úteis a somatotropina bovina e a somatotropina porcina.

Devido à capacidade para produzir quantidades substanciais de somatotropina, é preferido usar técnicas de ADN recombinante a fim de expressar microbianamente a somatotropina. Adicionalmente, as técnicas de ADN recombinante permitem a produção de variantes, que são ou semelhantes ou diferentes das sequências das somatotropinas que ocorrem naturalmente. As sequências para as somatotropinas bovina e porcina que ocorrem naturalmente são indicadas em Seeburg, et al., DNA, Vol. 2, Nº. pp 37-45 (1983), o qual é aqui incorporado como referência. Nas variantes indicadas a seguir, A N-metionina pode por vezes ser removida durante ou após a expressão.

Exemplos de variantes da somatotropina bovina incluem, mas não são limitadas por, polipeptídeos tendo as sequências de amino ácidos que se seguem sendo os resíduos não especificados dos amino ácido semelhantes aos da somatotropina que ocorre naturalmente:

NH₂-met-fe(1)-pro(2)....leu(126)....fen (190)-COOH
NH₂-met-fe(1)-pro(2)....val(126)....fen(190)-COOH
NH₂-ala-fe(1)-pro(2)....val(126)....fen(190)-COOH
NH₂-ala-fe(1)-pro(2)....leu(126)....fen(190)-COOH
NH₂-fe(1)-pro(2)....leu(126)....fen(190)-COOH
NH₂-fe(1)-pro(2)....val(126)....fen(190)-COOH
NH₂-met-asp-glu-fe(1)-pro(2)....leu(126)....fen(190)-COOH
NH₂-met-asp-glu-fe(1)-pro(2)....val(126)....fen(190)-COOH
NH₂-met(4)-ser(5)....leu(126)....fen(190)-COOH
NH₂-met(4)-ser(5)....val(126)....fen(190)-COOH

Como se pode observar do atrás indicado, estas variantes podem ter facultativamente um resíduo metionilo no término-N. A primeira variante na lista atrás referida, com um resíduo metionilo no término-N, e um resíduo leucilo na posição 126 é aqui mencionada como metionil-somatotropina bovina ou "MBS", e a terceira variante na lista atrás referida, com um resíduo alanilo no término-N e um resíduo valilo na posição 126 é mencionado como alanil-valil-somatotropina bovina ou "ala-val BST".

Exemplo de variantes da somatotropina porcina incluem, mas não são limitadas por, polipeptídeos tendo as sequências de amino ácidos que se seguem, sendo os resíduos não especificados de amino ácidos semelhantes aos da somatotropina que ocorre naturalmente:

NH₂-ala-fe(1)....fen(190)-COOH
NH₂-met-fe(1)....fen(190)-COOH
NH₂-met(4)-pro(1)....fen(190)-COOH
NH₂-met(6)-ser(7)....fen(190)-COOH

A primeira variante na lista atrás referida, com um resíduo alanilo no término-N é aqui mencionada como alanil-somatotropina porcina ou "APS". A segunda variante na lista atrás referida é aqui mencionada como metionil-somatotropina porcina ou "MPS".

Embora a utilização de variantes da somatotropina possa em algumas circunstancias ser útil e vantajosa, devem ser tomadas precauções de modo a que a variante não difira de tal modo da somatotropina que ocorre naturalmente que leve ao ponto da bioactividade ser afectada com um prejuizo intolerável, ou da variante desencadear a produção intolerável de anticorpos indesejáveis.

Para que seja biologicamente activa, a somatotropina deve ter uma determinada natureza, isto é, possuir uma estrutura dobrada que resulte em actividade biológica. Embora seja preferível minimizar a presença de polipeptido inactivo, podem estar presentes umas certas quantidades, contando que não levem a uma inibição intolerável da actividade da somatotropina bioactiva.

Nas técnicas anteriores, a libertação da somatotropina de um sistema de libertação prolongada foi regulada por um mecanismo envolvendo um outro componente do sistema, por exemplo, erosão de uma matriz, etc. NO presente invento, a libertação da somatotropina é regulada pelas propriedades da própria somatotropina e pode ser também influenciada num certo grau por factores tais como o tamanho e o formato do artigo e pelo processo da sua produção.

As propriedades da somatotropina que mais influenciam as características são a sua solubilidade, e a sua taxa de dissolução. Esta combinação de propriedades será referida como "dissolução intrínseca". A dissolução intrínseca, e algumas outras propriedades da somatotropina, podem ser manipuladas de maneiras variadas. As diferentes variantes de somatotropina têm frequentemente solubilidades e/ou taxas de dissolução um tanto diferentes, e consequentemente a dissolução intrínseca pode ser por vezes manipulada até um certo ponto pela escolha de uma variante. O método de isolamento da somatotropina sólida, por exemplo a pH de precipitação de uma somatotropina precipitada ou as condições de liofilização de somatotropinas em soluções liofilizadas podem também influenciar de um certo modo a dissolução intrínseca. A dissolução intrínseca pode também ser manipulada para utilização de uma somatotropina que está associada com um outro ião ou com um outro composto tal como um sal. A estrutura real deste tipo de associação não é clara, mas pensa-se que existem sais, complexos misturas íntimas formados por co-precipitação, ou por uma determinada combinação destas três formas. Nesta apresentação detalhada e nas reivindicações, quando é desejado fazer referência a uma somatotropina que está associada com um determinado ião ou com um determinado sal, aquela será referida, por exemplo, como uma somatotropina bovina associada com zinco, somatotropina porcina associada com cobre, ou somatotropina bovina associada com bicarbonato. Quanto referida na generalidade, ela será referida simplesmente como uma somatotropina associada.

As somatotropina associadas podem ser formadas com quantidades não tóxicas de vários catiões, incluindo os metais tanto monovalentes como polivalentes. Exemplos de metais monovalentes apropriados incluem sódio, potássio, etc. Exemplos de metais polivalentes apropriados incluem zinco, ferro, cálcio, bismuto, bário, magnésio, manganésio, alumínio, cobre, cobalto, níquel, cádmio, etc. Contudo, particularmente com metais polivalentes que podem em

certas circunstancias ser tóxicos, deve tomar-se a precaução de utilizar quantidades não tóxicas. As somatotropinas associadas podem também ser formadas com aniões, tais como bicarbonato, acetato, glicina, borato, etc. Podem também ser usadas combinações de catiões, aniões e de outros compostos. A relação entre catião, anião ou outros compostos e a somatotropina pode variar dependendo das condições e da somatotropina utilizada. Alguns ou todos os iões podem estar associados num sal de um dos amino ácidos na somatotropina, podem estar escondidos em dobras ou cristais da somatotropina, podem estar associados sob a forma de uma ponte iônica entre pelo menos duas moléculas de somatotropinas, podem estar associados sob a forma de um complexo com a somatotropina, ou podem estar associados de qualquer outro modo.

Exemplos de outras somatotropinas associadas incluem a) sais de adição de ácido formados com ácidos inorgânicos, tais como ácidos clorídrico, bromídrico, sulfúrico, fosfórico ou nítrico; ou com ácidos orgânicos tais como ácidos acético, oxálico, tartárico, succínico, maleico, fumárico, glucônico, cítrico, málico, ascórbico, benzílico, tânico, pamoico, algínico, poliglutâmico, naftalenosulfônico, naftaleno-dissulfônico ou poligalacturônico; b) sais com compostos orgânicos polifuncionais tais como N,N'-dibenziletilenodiamina ou etilenodiamina ou procaina; ou c) combinações de dois ou mais dos tipos atrás referidos de sais tal como tanato de zinco.

Muitos dos benefícios das somatotropinas associadas podem ser alcançados misturando somatotropina em pó com um sal do catião ou anião desejado ou como o composto desejado, antes da formação do artigo. Pensa-se que as somatotropinas associadas se formam in situ, durante a formação do artigo, ou após a administração do artigo ao animal.

Se a somatotropina associada for relativamente menos solúvel, ela poderá ser produzida adicionando os desejados sal solúvel na água ou o composto solúvel na água do ião desejado, a uma solução da somatotropina, com o pH desejado, para precipitar a somatotropina associada desejada. Por exemplo, a somatotropina bovina ou porcina associada com zinco pode ser produzida pela adição de um sal de zinco solúvel na água a uma solução aquosa na somatotropina tamponada com um agente apropriado. O pH preferido varia entre cerca de 9 e cerca de 9,5.

Se a somatotropina associada for relativamente mais solúvel, ela poderá ser produzida por liofilização de uma solução da somatotropina com o sal desejado dos iões desejados. Esta solução pode ser produzida por diálises múltiplas ou por diafiltração de, por exemplo, uma solução de ureia para permutar a ureia com o sal desejado, seguindo-se diálise ou diafiltração com água para reduzir a concentração do sal até ao nível desejado. Por exemplo, a somatotropina bovina associada com bicarbonato de sódio pode ser produzida por diafiltração ou diálise de uma solução de ureia da somatotropina para se conseguir uma permuta completa da ureia, com uma solução de bicarbonato de sódio, seguindo-se uma posterior diafiltração com água para remoção do excesso de bicarbonato de sódio, seguindo-se liofilização para produzir a somatotropina associada com bicarbonato de sódio.

As somatotropinas são frequentemente processadas e purificadas numa solução tampão, tal como bicarbonato de sódio. É preferível ajustar a concentração do bicarbonato de sódio por diálise ou por diafiltração até se obter a concentração desejada. O pH pode ser mantido entre valores com os quais a somatotropina seja solúvel pela adição de uma base, tal como NaOH, à água da diálise ou à solução de somatotropina. A somatotropina pode então ser re-

cuperada por vários meios, tais como por ajustamento do pH com um ácido apropriado, tal como HCl, para precipitar a somatotropina seguindo-se a diafiltração e a liofilização ou por meio de liofilização directa da solução de somatotropina. É preferido que a somatotropina produzida deste modo tenha uma concentração do sal tampão, por exemplo bicarbonato de sódio, entre cerca de 0% e cerca de 20%, com maior preferência entre cerca de 0% e cerca de 5%, e com a maior preferência cerca de 1% ou menos. Uma concentração mais elevada de bicarbonato de sódio faz aumentar a dissolução intrínseca da somatotropina, resultando num produto útil para libertação num período de tempo mais curto. Pelo contrário, uma concentração mais baixa de bicarbonato, resulta num produto útil para libertação num período de tempo mais longo. Deste modo, o produto pode ser planeado para o período de tempo desejado.

Um outro método para a preparação da somatotropina consiste em isolar e purificar a somatotropina, o que é tipicamente realizado em condições alcalinas, seguindo-se diálise para a reposição do tampão e adição de um ácido, tal como ácido fosfórico para produzir uma solução acídica da somatotropina. A somatotropina pode então ser recuperada a partir da sua solução acídica, por exemplo, pela adição de uma base para elevar o pH da solução até um ponto em que a somatotropina precipite. Deve-se ter cuidado quando se utiliza este processo, para se assegurar que o pH não seja tão reduzido que a somatotropina seja desnaturada.

A somatotropina porcina tem uma dissolução intrínseca que é de certo modo superior à da somatotropina bovina. Por esta razão, é preferido usar uma somatotropina porcina associada com cobre. Esta somatotropina porcina associada com cobre pode conter entre cerca de 0,1% de cobre e cerca de 3% de cobre, de preferência entre cerca de 0,1% de cobre e cerca de 2% de cobre e com maior preferência entre cerca de 0,1% de cobre e cerca de 1% de cobre. Uma

somatotropina porcina associada com cobre particularmente preferida tem uma relação de cerca de 1:1 entre o cobre e a somatotropina, o que representa cerca de 0,3% de cobre. A somatotropina porcina associada com cobre proporciona um aumento da libertação prolongada e uma melhor eficiência da administração da somatotropina porcina. Adicionalmente, existem certas indicações de que a somatotropina porcina associada com cobre apresenta uma tendência reduzida para formar dímeros e outros agregados, particularmente após a administração ao animal. A variante preferida é APS.

Muitas das vantagens de uma somatotropina porcina associada com cobre podem ser conseguidas pela utilização de uma mistura física da somatotropina porcina com a quantidade apropriada de um sal de cobre. Quando se utilizam misturas secas, o sal de cobre adicional deve ser adicionado à composição numa quantidade superior à requerida para produzir uma somatotropina associada com cobre com as propriedades desejadas. Por exemplo, uma mistura seca de sal de cobre e de somatotropina porcina com uma relação molar de 2:1 entre o cobre e a somatotropina possuirá características de libertação semelhantes às da somatotropina porcina associada com cobre precipitada com uma relação molar de 1:1. Pensa-se que a somatotropina porcina associada com cobre se forma in situ durante a compressão ou, mais provavelmente, após a administração.

A libertação da somatotropina pode também ser manipulada pelo controlo da geometria da libertação do artigo. Isto pode ser realizado, por exemplo, pela escolha do tamanho e do formato do artigo ou por oclusão de uma porção ou da totalidade da área da superfície do artigo com um revestimento. Ambas as técnicas são discutidas a seguir.

Os artigos moldados de somatotropina deste invento podem ser preparados usando técnicas con-

vencionais, tais como técnicas de compressão , de acreção por secagem por pulverização, de prilling, moldagem de uma pasta húmida e secagem do artigo moldado, etc. Porque a compressão constitui o método mais habitualmente utilizado para a formação de implantes parentéricos, e tendo em vista a simplificação, o presente invento será discutido em termos de formação por compressão.

O presente invento pode ser produzido numa máquina para formação convencional de comprimidos utilizando moldes de tamanho e formato apropriados e utilizando a pressão dentro dos limites convencionais. Os processos convencionais de manipulação e de compressão; por exemplo, a somatotropina pode ser pré-comprimida e fragmentada para melhorar as características de manipulação e de fluidez.

A performance (actuação) pode ser melhorada por meio de escolha cuidadosa do tamanho e do formato do artigo. O artigo pode ser cilíndrico, esférico, oval, ou apresentar qualquer outra forma conveniente. A fim de maximizar o período de tempo durante o qual ocorre a libertação, é preferível utilizar um formato que possua um mínimo de área superficial para uma determinada dosagem. Se se utilizar um único artigo, este pode ser realizado produzindo um implante esférico, ou produzindo um implante cilíndrico em que a altura do cilindro é aproximadamente igual ao seu diâmetro. Contudo, podem ser usadas outras formas e tamanhos se se desejar períodos de tempo mais curtos e ainda por várias outras razões. Por exemplo, é também vantajoso produzir um artigo que possa ser administrado usando dispositivos convencionais para a administração parentérica de pílulas ou de comprimidos. Se se utilizarem estas "pistolas de implante", é preferível que o artigo moldado deste invento seja um cilindro e tenha um diâmetro entre cerca de 1 mm e cerca de 5 mm e um comprimento entre de 1 mm e cerca de 25 mm. Contudo, podem ser utilizados, de desejado, diâmetros entre cerca de

0,5 mm e cerca de 12 mm e comprimentos entre cerca de 1 mm e cerca de 50 mm, e mesmo tamanhos para além destas variações. Se o tamanho ou o formato do artigo ou o local da administração assim o requerem, será também possível realizar uma implantação cirúrgica. Podem ser implantados artigos múltiplos, se a dose desejada for demasiadamente grande para ser convenientemente administrada num artigo, ou se desejado por qualquer outra razão, tal como uma maior flexibilidade da dose.

E preferido que a dissolução intrínseca e que a área da superfície de libertação sejam manipuladas de modo a conseguir-se uma taxa de libertação diária média ao longo da duração efectiva do artigo na variação desejada. Para aplicações diárias, a taxa de libertação diária média pode variar entre cerca de 1 mg e cerca de 75 mg ou mesmo 100 mg por dia, de preferência entre cerca de 3 mg e cerca de 50 mg por dia, e com maior preferência entre cerca de 6 mg e cerca de 40 mg por dia. Para aplicações a suínos, a taxa de libertação diária média pode variar entre cerca de 0,5 mg e cerca de 25 ou mesmo 30 mg por dia, de preferência entre cerca de 1 mg e cerca de 20 mg por dia, com maior preferência entre cerca de 2 mg e cerca de 15 mg por dia. As taxas de libertação diária média para além destes limites pode por vezes ser útil, dependendo do resultado desejado. A dose total de somatotropina deve ser suficiente para manter a taxa de libertação desejada para períodos de tempo desejados tal como será discutido mais abaixo.

A dose total de somatotropina relaciona-se com um grande número de factores, tais como o tamanho do animal, o efeito que se pretende alcançar com a somatotropina administrada, o período de tempo durante o qual se pretende o qual se pretende que a dose dure, etc. Tal como é usada nesta apresentação detalhada e nestas reivindicações, uma dose eficaz é uma dose de somatotropina bioactiva, contida quer num artigo quer em múltiplos artigos destinados

a ser administrados conjuntamente, o que é eficaz para se conseguir o efeito desejado durante um período de tempo prolongado, por vezes de apenas 1 ou 2 dias, mas mais frequentemente superior a 7 dias, nalguns casos até cerca de 28 dias ou mesmo até 48 dias ou mais.

Tendo como finalidade a administração da somatotropina a vacas, para aumentar a produção de leite, é preferido que a dose varie entre cerca de 5 mg e cerca de 1.000 mg ou 1500 mg ou mais, com maior preferência entre cerca de 100 mg e cerca de 800 mg, e que seja administrada com intervalos de cerca de 1 dia a cerca de 28 dias ou mais ou com maior preferência de cerca de 7 dias a cerca de 28 dias. Para administração de somatotropina a porcas prenhas e a porcas leiteiras é preferido que a dose varie entre cerca de 5 mg e cerca de 225 mg ou mais, com maior preferência entre cerca de 75 mg e cerca de 150 mg e que seja administrada com intervalos de cerca de 1 dia a cerca de 28 dias, de preferência cerca de 7 dias a cerca de 21 dias. Para administração a porcos para abate a fim de facilitar um aumento de peso e aumentar a eficiência alimentar ou para melhorar a relação gordura-carne limpa, é preferível que as doses variem entre cerca de 10 mg e cerca de 200 mg ou mais, com maior preferência entre cerca de 10 mg e cerca de 90 mg, e que sejam administradas com intervalos de cerca de 7 dias a cerca de 60 dias, de preferência de cerca de 14 dias a cerca de 42 dias ou, para porcos quase completamente desenvolvidos, pode ser desejável administrar uma dose durante cerca de 7 dias a cerca de 60 dias antes do abate. A administração com intervalos mais curtos a porcos quase completamente desenvolvidos pode ser vantajosa, particularmente mais para o fim desse período. Isto pode permitir uma maior flexibilidade para o esquema de administração para que coincida com maior exactidão com a altura escolhida para o abate. Contudo, a administração mais frequente ou menos frequente pode ser utilizada eficazmente nalgumas circunstâncias e doses maiores ou menores podem também ser utilizados eficazmente em

circunstâncias apropriadas.

A intensidade da pressão utilizada para a formação de um artigo de somatotropina comprimida não é de importancia crítica, contudo, a performance (actuação) pode de um certo modo ser manipulada por escolha cuidadosa da pressão. Pode ser utilizada uma pressão suficiente para produzir um artigo com resistência e integridade suficientes de modo a poder aguentar a manipulação e a implantação.

Um método adicional para o controlo da taxa de libertação consiste em ocluir uma porção da área superficial total do artigo, para reduzir a quantidade de superfície a partir da qual se dá a dissolução.

Pode ser utilizado um revestimento para substancialmente inibir ou fazer parar quase completamente a libertação da somatotropina a partir de algumas superfícies do objecto, para controlar a geometria da superfície de libertação, por exemplo, para manter uma área constante de superfície de libertação. Isto pode auxiliar a atingir uma libertação prolongada da ordem zero da somatotropina a partir da superfície de libertação não revestida, a qual constitui a principal superfície de libertação. Por exemplo, o artigo somatotropina do presente invento pode ser um cilindro com um revestimento numa ou em ambas as extremidades. Deste modo, à medida que a somatotropina vai sendo libertada, e o artigo sofre erosão, a área de superfície de libertação permanece relativamente constante, em vez de diminuir, o que aconteceria se a libertação ocorresse a partir de todas as superfícies do cilindro. Adicionalmente o revestimento pode cobrir a maior parte do artigo, exceptuando uma ou mais "janelas" de libertação, o que mantém uma área de libertação bastante constante ou longo do tempo.

Para maximizar este tipo de efeito, por exemplo, para um artigo cilíndrico revestido sobre a totalidade da superfície curva, é preferível que o revestimento iniba substancialmente a libertação da somatotropina ao longo da superfície revestida, e que o revestimento permaneça intacto sobre a restante superfície curva do cilindro enquanto a libertação ocorre a partir da(s) extremidade(s) não revestida(s). O revestimento pode também sofrer erosão a partir de um ou de ambas as extremidades à medida que a somatotropina sofre erosão. É preferível que o revestimento mantenha a sua eficácia ao longo de uma substancial maior parte da vida do artigo após a administração. Contudo, podem ser conseguidos resultados úteis com qualquer revestimento que proporciona pelo menos uma inibição substancial da libertação da somatotropina, contanto que a principal superfície de libertação se apresente não revestida. Pode também ser preferível, particularmente se o animal for submetido a uma administração repetida de somatotropina, que o revestimento seja eventualmente absorvido pelo animal e, evidentemente, o revestimento deverá ser biocompatível. Exemplos de substâncias que podem ser usadas para proporcionar esse revestimento parcial para um artigo de somatotropina incluem, mas não são limitados a, goma laca, cera de abelha, butirato de acetato de celulose, ácido poliacético, celulose etílica, silicões, copolímero de acetato de vinilo etilénico, celulose hidroxipropílica, policarbonato, policaprolactona, acetato de celulose, metacrilato polimetílico e uma série de outros polímeros conhecidos para utilização como revestimentos que servem de barreira.

Pode-se conseguir um resultado semelhante produzindo um artigo com uma camada exterior, por exemplo sobre a superfície curva de um artigo cilíndrico, de uma somatotropina associada relativamente menos solúvel, tal como somatotropina associada com zinco.

Pode ser útil no presente invento uma cobertura protectora temporário. Pode ser vantajoso proporcionar o artigo somatotropina com uma cobertura ligeira para proteger o artigo durante o armazenamento e a manipulação, e que possivelmente auxilie a administração do artigo ao animal. Para que este tipo de cobertura seja útil no presente invento, a cobertura deve ou ter que ser removido antes da administração ao animal, por meio de um processo curto de embeboamento ou de lavagem, ou deve ser removido do artigo muito rapidamente após a administração ao animal. Esta cobertura protectora, temporária, deve ter um efeito muito pequeno sobre o controlo da libertação da somatotropina, e após remoção da cobertura, o artigo libertará somatotropina a partir de pelo menos uma superfície de libertação não revestida. Como este tipo de cobertura tem um efeito pequeno ou nulo sobre a libertação, não é considerado como sendo um "revestimento" nesta apresentação detalhada e nas reivindicações. Esta cobertura protectora, temporária, pode ser também usada juntamente com o revestimento mais permanente atrás discutido. Esta cobertura protectora pode simplesmente ser constituída por uma aplicação mais delgada dos materiais de revestimento atrás discutidos contando que este revestimento mais delgado seja removido rapidamente do artigo, quer antes quer imediatamente após a implatação, ou pode ser uma cobertura que é removida rapidamente do artigo, por exemplo devido à sua solubilidade, visto fundir-se à temperatura do corpo, devido a combinação de solubilidade e de temperatura de fusão ou por qualquer outra razão. Materiais apropriados para este tipo de cobertura incluem, mas não se limitam a: álcool polivinílico, açúcares, polietileno glicol (tal como PEG 8.000), e outras substâncias.

Para além da somatotropina e do revestimento facultativo e da cobertura protectora facultativa atrás indicados, pode ser vantajoso incluir outras substâncias na composição do artigo do presente invento. Como exemplos temos agentes lubrificantes, bacteriostáticos, anti

-inflamatórios, antibióticos, etc. Podem ser utilizados lubrificantes convencionais para auxiliar o processo de compressão. Exemplos desses lubrificantes incluem estearatos, tais como estearato de magnésio, palmitatos, tais como palmitato de sódio, e outros lubrificantes convencionais. A quantidade de lubrificante presente deve ser suficiente para permitir que a somatotropina flua livremente e facilmente para os moldes e para permitir que o artigo seja removido facilmente do molde sem lesão do artigo. Contudo, o lubrificante não deve estar presente em quantidades suficientes para que actue como um agente de matriz, ou para que de qualquer modo afecte com prejuízo intolerável a libertação da somatotropina. Por exemplo, o estearato de magnésio possui um efeito pequeno ou nulo sobre a libertação da somatotropina até uma concentração de cerca de 10%. Quando usado em concentrações excedendo 30-50%, o estearato de magnésio inibe significativamente a libertação da somatotropina do artigo. De um modo semelhante, o palmitato de sódio tem um efeito pequeno ou nulo sobre a libertação da somatotropina até uma concentração de 3%. Quando usado em concentrações excedendo cerca de 10%, o palmitato de sódio inibe significativamente ou totalmente a libertação. O efeito de concentração que se situam entre estas concentrações indicadas pode ser determinado por meio de testes de rotina. De um modo semelhante, as variações da concentração eficaz para outros lubrificantes convencionais pode ser determinada por meio de processos simples.

Podem ser incluídos usando técnicas convencionais, outros ingredientes tais como agentes anti-oxidantes, anti-inflamatórios, bacteriostáticos, antibióticos, para inibirem a agregação da somatotropina, etc. Contudo, estes ingredientes também não devem estar presentes numa quantidade tal que actuem como agentes de matriz ou de outras maneiras que afectam com prejuízo intolerável a libertação da somatotropina. Estas concentrações eficazes podem ser determinadas de um modo semelhante ao processo utilizado para os lubrificantes atrás discutidos. Nalguns casos pode

ser usada irradiação para aumentar a esterilidade, contudo, deve-se ter cuidado visto que as radiações podem, em certas, circunstâncias, reduzir a biodisponibilidade da somatotropina.

Pode ser vantajoso para algumas somatotropinas, ajustar a quantidade de água presente na somatotropina, quer por meio de um controlo cuidadoso das técnicas de secagem, tais como liofilização, quer permitindo que a somatotropina liofilizada seja exposta a uma atmosfera contendo vapor de água, até que esteja presente na composição a quantidade desejada de água. Contudo, estes ajustamentos não devem ser realizados em condições que promovam a desnaturação da somatotropina, a formação de agregados, ou outra degradação da somatotropina ou da sua eficácia. Tudo isto pode ser realizado quer antes quer depois da formação do artigo, e pode ser realizado por meio de outras técnicas.

O artigo deste invento pode ser administrado de um modo convencional, quer subcutâneamente, nos tecidos gordos (adiposa), ou intramuscularmente. Pode ser administrado quer cirúrgicamente quer utilizando dispositivos convencionais de implantação.

Os exemplo que se seguem ilustram o presente invento, e não pretendem ser limitativos. Todas as partes e percentagens são em peso, a não ser que indicado de um modo diferente.

EXEMPLO 1

MBS expressa microbianamente foi preparada por expressão de ADN recombinante essencialmente tal como foi descrito no Exemplo A do Requerimento da Patente Europeia Nº 177.478, publicada em 9 de Abril, 1986, o qual é aqui incorporado como referência. Os corpos refrácteis foram isolados por meio de rutura de células, seguida por centrifugação. Os corpos refrácteis foram então solubilizados, dobrados e oxidados numa solução de ureia e tampão trisshidroximetil amino metano (TRIS). A solução de MBS tamponada foi feita passar através de uma coluna de cromatografia contendo resina de permuta iônica DE-52. A concentração desta solução foi ajustada para 22 mg/ml de MBS numa solução de ureia 4,5M e 50 mM de tampão trishidroximetil amino metano (TRIS) com um pH de 9,3-9,5. Esta solução foi filtrada em condições de esterilidade através de uma película de filtro de 0,22 micron. A solução filtrada foi dialisada contra um tampão bicarbonato de sódio 25 mM com um volume de 7 vezes (com um pH de 9,5), substituindo a solução tampão 8 vezes, uma vez de 8-12 em 8-12 horas. Então, a solução tampão foi substituída por água de grau-WFI, mudada de 8-12 em 8-12 horas. A medida que o pH caia para 8-8,5, a MBS começou a precipitar a partir da solução. A diálise foi mantida durante 4-6 mudanças adicionais com água, para posteriormente reduzir a concentração dos componentes residuais do tampão, até o pH se situar entre 6,5-7,5. A MBS precipitado foi então liofilizado e recuperado sob a forma de um pó branco. A MBS preparada deste modo foi usado para preparar artigos de somatotropina comprimida para implantação parentérica em gado bovino em lactação (leiteiro), tal como é descrito a seguir.

EXEMPLO 2

Os artigos de somatotropina comprimida foram preparados a partir da MBS preparado tal como no Exemplo 1. 50 mg desta MBS foram colocados num molde para fazer comprimidos com um diâmetro de 6,4 mm e foram comprimidos numa prensa para formar comprimidos Carver Modelo-C 12 Ton com um êmbolo hidráulico tendo uma área de 21.25 cm² (3,294 polegadas quadradas), com uma carga aplicada de 17,790 newtons (4.000 libras) de acordo com a leitura feita na escala. Dez destes artigos comprimidos com 50 mg, foram cirurgicamente implantados subcutâneamente na região poscapsular em 8 vacas leiteiras Holstein no dia 0, dia 14, e dia 28. Foi implantado em cada uma das vacas tratadas um total de 30 artigos comprimidos. A produção de leite das vacas tratadas durante um período de 56 dias foi comparada com um grupo de 9 vacas de controlo (testemunhas) que não receberam somatotropina. O aumento na produção de leite e o leite corrigido em 3,5% de gordura (3,5 FC) das vacas tratadas em relação às vacas não tratadas é resumido no Quadro I e indicado graficamente na Figura 1.

QUADRO I

<u>Dias</u>	<u>Aumento no Leite Real (kg/dia)</u>	<u>Aumento no Leite 3,5 FC (kg/dia)</u>	<u>% do Aumento no Leite FC em Relação ao Controlo</u>
1-14	3,7	4,1	14,7%
15-28	11,6	11,9	43,4
29-42	9,6	9,6	34,9
43-49	9,5	10,6	39,1
50-56	6,3	5,1	19,2

As amostras de sangue foram colhidas diariamente ao longo do estudo e o soro sanguíneo foi analisado por meio de ensaio radio imunitário (RIA) em relação à somatotropina. Os níveis no soro determinados são indicados graficamente na Figura 2. A produção de leite foi consistente com o perfil de somatotropina no soro observado.

EXEMPLO 3

Um grupo de 14 vacas não leiteiras Holstein foi dividido em dois grupos de 7. Um grupo recebeu uma implantação cirúrgica tal como foi descrito no Exemplo 2, de dez dos artigos MBS de 50 mg preparados tal como foi descrito no Exemplo 2, e o outro grupo foi submetido a processos cirúrgicos simulados. Foram então recolhidas dez amostras de sangue durante o dia 1, 6 amostras nos dias 2 e 3, 3 amostras nos dias 4 a 14 e 2 amostras nos dias 15 a 21. O nível da somatotropina no soro sanguíneo foi determinado por RIA, e os resultados são indicados na Figura 3. Os níveis no soro neste estudo foram um pouco mais baixos do que no estudo com lactação no Exemplo 3. A razão para este nível mais baixo não se compreende, mas pensa-se que possa estar relacionada com flutuações normais na produção natural de somatotropina. Contudo, foi observada uma elevação estável durante 17 ou 18 dias.

EXEMPLO 4

Cinco dos artigos MBS de 50 mg preparados tal como foi descrito no Exemplo 2 foram implantados cirúrgicamente em 5 bezerras não leiteiras Holstein na região p^oscapsular direita ou esquerda anterior ou posterior nos dias 0, 3, 7 e 14 do estudo. No dia 14, os animais foram sacrificados, sendo feitas análises dos tecidos. Não se observou qualquer reacção tecidular adversa, o que indicou boa biocompatibilidade.

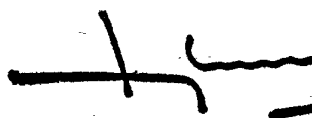
EXEMPLO 5

APS expressa microbianamente foi preparada por expressão de ADN recombinante substancialmente tal como foi descrito no Exemplo 3B do Requerimento da Patente Europeia No.193.515 publicado em 3 de Setembro, 1986, a qual é aqui incorporada como referência. Os corpos refracteis de APS foram isolados, solubilizados, naturados e purificados tal como foi descrito no Exemplo 1 ao longo do passo de permuta iônica. A solução tamponada de APS foi dialidada contra uma solução de tampão bicarbonato de sódio, e a solução resultante tamponada pelo bicarbonato foi filtrada em condições estéreis e liofilizada. Este material é mencionado nos Exemplos como "pó da massa de APS". 5,4 g deste APS foram dissolvidos em 250 ml de água desionizada e dialisados contra 4 mudas de 16 volumes de água durante 24 horas a 4°C. A APS dializada foi precipitada com um pH 6-8 com 350 moles de 100 mM de solução de sulfato de cobre. O precipitado formado pela adição do sulfato de cobre foi isolado por centri-

fugação e foi liofilizado. O produto resultante tinha um conteúdo de cobre de 0,43%.

EXEMPLO 6

Foram preparados artigos comprimidos a partir do pó da massa de APS e a partir da APS associada com cobre ambos produzidos tal como no Exemplo 5. A APS associada com cobre foi produzida usando uma relação molar entre o cobre e a APS de 1,2-1,4:1. O processo de compressão usado foi geralmente o descrito no Exemplo 2, exceptuando o facto de se usar como lubrificante 1% de palmitato de sódio (NaP) ou 5% de estearato de magnésio (MGS), excepto onde indicado. Uma quantidade suficiente da formulação de somatotropina para dar origem a doses de somatotropina de 60 mg e de 90 mg foi colocada num molde de 2,4 mm ou 3,2 mm e comprimida com a aplicação de uma carga de 4.448 newtons (1.000 libras). Estes artigos comprimidos foram implantados parentéricamente em porcos em período final de crescimento provenientes de cruzamento de raças de tipo comercial. Foram também determinados o aumento de peso diário médio em kg/dia (ADG) e da eficiência alimentar (FE) a qual é definida como a ingestão alimentar diária dividida por ADG (um FE mais baixo é um FE melhor), e a % de melhoria no FE dos porcos implantados em comparação com os controlos (testemunhas) negativos que não receberam somatotropina. Estes resultados e os resultados para um grupo de porcos de controlo positivo, que receberam injecções diárias de 2 mg de APS em solução são resumidos no Quadro II. O primeiro estadio do periodo do teste foi de 14 dias, seguindo-se um período intermediário de 7 dias, seguindo-se um segundo estadio de

 -29-

período de teste de 14 dias. Os resultados são resumidos no Quadro II.

QUADRO II

Estadio 1

	Controlo- (sem trata- mento)	Controlo+ (2mg/ Dia)	Tipo: Diam: Dose: Lubr: Local:	Cu 3 mm 60 mg NaP Orelha	Cu 3 mm 60 mg NaP Gordura	APS 3 mm 2x30 mg NaP Orelha	APS 3 mm 6x10 mg NaP Orelha
ADG (kg)	,98	1,11		1,03	1,03	,95	,87
FE (alimento/ ganho)	4,10	3,24		3,43	3,61	3,73	4,29
% Aum. FE	--	--		16,3%	12,0%	9,0%	--

Estadio 2

	Controlo- (sem trata- mento)	Controlo+ (2mg/ Dia)	Tipo: Diam: Dose: Lubr: Local:	Cu 3 mm 60 mg NaP Orelha	Cu 3 mm 60 mg NaP Gordura	Cu 2 mm 60 mg MgS Orelha	Cu 3 mm 90 mg NaP Orelha
ADG (kg)	,90	1,02		1,07	1,05	1,02	1,12
FE (alimento/ ganho)	4,81	3,78		3,63	3,74	3,61	3,19
% Aum. FE	--	--		24,5%	22,2%	25,0%	33,7%
1 10% de palmitato de sódio							
2 2% de palmitato de sódio							

Os artigos implantados do presente invento apresentaram-se favoráveis quando comparados com a injeção diária e resultaram num aumento substancial do ganho de peso e da eficiência alimentar em comparação com porcos não tratados. O nível de 10% de palmitato de sódio resultou em prejuízo da libertação da somatotropina, de modo que 10% de palmitato de sódio é um valor superior à quantidade eficaz de lubrificante.

EXEMPLO 7

Os artigos comprimidos foram preparados a partir de pó da massa de APS que tinha sido isolado e purificado tal como no Exemplo 5. O processo utilizado foi geralmente o do Exemplo 2, exceptuando o facto de artigos com 30 mg, com um diâmetro de 6,4 mm serem preparados usando uma força aplicada de 17.790 newtons (4.000 libras) e artigos de 60 mg com um diâmetro de 6,4 mm serem preparados usando uma força aplicada de 17.790 newtons (4.000 libras). Estes artigos foram implantados cirurgicamente na gordura (no tecido adiposo) na parte posterior do pescoço, no primeiro dia do estudo. Foi preparado um segundo grupo de artigos com 3,2 mm de diâmetro sob 4.448 newtons (1.000 libras) com 30 mg e 60 mg, respectivamente de somatotropina. Estes artigos foram implantados na gordura da parte posterior do pescoço com uma pistola de implantação. Este segundo grupo de artigos com 3,2 mm foi implantado no dia 15 do estudo. Os porcos usados eram porcos na fase final de crescimento de raça cruzada do tipo comercial, com 10 porcos a receberem os artigos com 30 mg, 10 porcos a receberem artigos de 60 mg, e 10 porcos eram porcos de controlo (testemunhas) que foram submetidos a processos cirúrgicos simulados semelhantes aos

dos porcos tratados. ADG, FE e % de aumento no FE foram determinados para os três grupos de porcos e são indicados no Quadro III.

QUADRO III

	<u>Controlo</u>	<u>30 mg</u>	<u>60 mg</u>
SEMANA 1			
ADG(kg)	,87	,94	1,02
FE(Alimento/ganho)	3,84	2,78	2,53
SEMANA 2			
ADG(kg)	,82	,77	,67
FE(Alimento/ganho)	4,27	4,62	4,58
SEMANA 1-2			
ADG(kg)	,85	,85	,84
FE(Alimento/ganho)	3,94	3,49	3,30
% Aum. FE	--	11,4%	16,2%
SEMANA 3			
ADG(kg)	,84	1,15	1,00
FE(alimento/ganho)	4,41	2,97	3,17
SEMANA 4			
ADG(kg)	,95	,71	,62
FE(alimento/ganho)	3,95	6,70	6,31
SEMANA 3-4			
ADG(kg)	,89	,93	,81
FE(alimento/ganho)	4,01	3,75	4,29
% Aum. FE	--	6,5%	--
SEMANAS 1-4			
ADG(kg)	,87	,89	,81
FE(alimento/ganho)	3,91	3,60	3,66
% Aum. FE	--	7,9%	6,4%

Estes dados demonstraram que estes artigos comprimidos possuem um período de libertação prolongado eficaz de cerca de 1 semana. Durante a segunda semana de cada ciclo de implantação os porcos tratados apresentaram a esperada redução da eficiência alimentar observada quando os porcos são privados da administração da somatotropina. Mesmo com estes períodos de eficiência alimentar reduzida, ambos os regimes de tratamento apresentaram aumentos de 7,9% e 6,4% na eficiência alimentar durante as 4 semanas do estudo.

EXEMPLO 8

Os artigos da somatotropina comprimidos foram preparados a partir do MBS preparado no Exemplo 1. O processo de compressão foi tal como no Exemplo 2, excetuando o molde de compressão que tinha um diâmetro de 3,2 mm e a força aplicada que era de 8.895 newtons (2.000 libras). Os artigos de 50 mg tinham cerca de 5 mm de comprimento. Um grupo de 9 vacas leiteiras Holstein recebeu 2 implantações subcutâneas na região pôscapsular de 5 artigos cada para um total de 500 mg, e um segundo grupo de 9 vacas recebeu 3 implantações semelhantes para um total de 750 mg. O aumento real da produção de leite e na produção de leite corrigido em 3,5% de gordura (leite FC) destas vacas tratadas em relação a um grupo de 10 vacas de controlo que não receberam somatotropina durante o período de 28 dias do teste e o aumento % no leite corrigido em 3,5% de gordura das vacas tratadas em comparação com as vacas de controlo são resumidos no Quadro IV.

QUADRO IV

<u>Dias/Dose</u>	<u>Aumento no Leite Real (kg/dia)</u>	<u>Aumento no Leite FC (kg/dia)</u>	<u>% de Aumento no Leite FC</u>
Dias 1-14			
500 mg	4,7	5,2	19,6%
750 mg	6,4	6,8	25,7
Dias 15-28			
500 mg	0,8	2,0	8,2%
750 mg	1,1	1,0	4,1

EXEMPLO 9

Os artigos de somatotropina comprimidos foram preparados a partir de MBS preparada tal como no Exemplo 1, à qual se adicionou como lubrificante 1% de estearato de magnésio. O processo de compressão foi o do Exemplo 2, exceptuando o facto do molde de comprimidos ter um diâmetro de 4,0 mm, e da carga aplicada ser de 8,895 newtons (2.000 libras). Os artigos de 50 mg tinham cerca de 3 mm de comprimento. Foi implantado um grupo de 10 artigos a um grupo de 8 vacas leiteiras Holstein, na região póscapsular no dia 0 e no 21. As dez vacas de controlo (testemunhas) não receberam somatotropina. Durante os dias 1-21, o aumento do leite corrigido em 3,5% de gordura em relação ao controlo foi de 8,5%, e durante os dias 22-42 foi de 14,3%. Os resultados deste exemplo foram afectados prejudicialmente por quebras abruptas na produção de leite num certo número de vacas do estudo à medida que se iam aproximando do fim do ciclo de

lactação.

EXEMPLO 10

A MBS expressa microbianamente foi preparada e purificada essencialmente tal como foi descrito no Exemplo 1, exceptuando o que se segue. O pH da solução do concentrado de MBS na ureia e TRIS foram ajustados para um pH de cerca de 10, pela adição de NaOH. Esta solução foi dia filtrada contra 10 volumes de água do grau WFI, tendo-se acrescentado NaOH adicional periódicamente para se manter o pH a cerca de 10. Após diafiltração, a solução de MBS foi lio filizada e obteve-se um pó seco. Este produto será mencionado como "solução liofilizada de MBS".

EXEMPLO 11

A MBS expressa microbianamente foi preparada e purificada essencialmente tal como foi descrito no Exemplo 10, exceptuando o facto da solução de MBS diafiltrada com um pH de 10 ser neutralizada com HCl para precipitar a MBS. A MBS precipitada foi liofilizada para produzir um pó seco. Este produto será mencionado como "MBS precipitada por HCl".

EXEMPLO 12

A MBS expressa microbianamente foi preparada e purificada essencialmente tal como foi descrito no Exemplo 1, exceptuando o que se segue. O pH da solução concentrada de MBS em ureia e TRIS foi ajustada para um pH de cerca de 4 pela adição de H_3PO_4 . Esta solução foi diafiltrada foi neutralizada com KOH para precipitar a MBS, a qual foi liofilizada para produzir um pó seco. Este produto será mencionado como "MBS precipitado por KOH".

EXEMPLO 13

Artigos de somatotropina comprimida foram preparados a partir da solução de MBS liofilizada preparada tal como no Exemplo 10 e a partir da MBS precipitada por HCl preparada tal como no Exemplo 11. O processo de compressão foi tal como o do Exemplo 2, exceptuando o facto de se ter adicionado 1% de estearato de magnésio como lubrificante, do diâmetro do molde ser de 4 mm e da carga aplicada ser de 8,895 newtons (2.000 libras). Os artigos de 50 mg tinham cerca de 3 mm de comprimento. Um grupo de 7 vacas Holstein receberam implantes de 10 dos artigos com 50 mg (dose total de 500 mg) de solução de MBS liofilizada e um outro grupo de 7 vacas Holstein receberam implantes de 10 dos artigos de 50 mg da MBS precipitada por HCL. Os implantes foram subcutâneos na região pôscapsular no dia 0 e no dia 21. Um grupo de 7 vacas de controlo receberam implantações simuladas. A produção de leite real e do leite corrigido em 3,5% de gordura das vacas tratadas, em comparação com as vacas de controlo que não receberam somatotropina são indicadas no Quadro V.

QUADRO V

<u>Semanas/Tipo MBS</u>	<u>Aumento no Leite Real (kg/dia)</u>	<u>Aumento no Leite 3,5 FC (kg/dia)</u>	<u>% de Aumento no Leite 3,5 FC</u>
Semanas 1-3			
Solução Liof.	5,3	4,9	20,6%
Precipitação HCl	2,6	2,8	11,8
Semanas 4-6			
Solução Liof.	5,9	5,9	27,1%
Precipitação HCl	2,8	3,5	16,1

A produção de leite durante a semana 7 revelou um ligeiro aumento numérico para as vacas tratadas com solução de MBS liofilizada em relação às vacas de controlo, mas não se verificou qualquer aumento com a MBS precipitada com HCl.

EXEMPLO 14

Foi realizado um estudo semelhante ao do Exemplo 13, exceptuando o facto de 8 vacas Holstein receberam uma solução de MBS liofilizada, 8 vacas Holstein receberam MBS precipitado pelo HCl, 8 vacas Holstein receberam MBS precipitado por KOH preparado tal como no Exemplo 12, e 8 vacas Holstein receberem implantes simulados. Ao longo do estudo de 42 dias a produção do leite das vacas que recebiam a solução liofilizada de MBS excedeu a das vacas de controlo em 4,5 kg/dia, a das vacas que recebiam MBS precipita-

da por KOH excedia a das vacas de controlo em 4,0 kg/dia.

EXEMPLO 15

Os artigos comprimidos foram preparados a partir de uma solução liofilizada de MBS tal como no Exemplo 13. Um grupo de 8 vacas Holstein recebeu uma implantação subcutânea pôscapsular de 6 dos artigos de 50 mg (dose de 300 mg) de 14 em 14 dias e um outro grupo de 8 vacas Holstein recebeu 10 dos artigos de 50 mg (dose de 500 mg) de 21 em 21 dias. Durante um período de estudo de 42 dias, o grupo recebendo 300 mg de 14 em 14 dias apresentou um aumento da produção de leite de 5,4 kg/dia em relação à produção de leite antes do tratamento dessas mesmas vacas. De um modo semelhante, durante um período de estudo de 42 dias, o grupo recebendo 500 mg de 21 em 21 dias apresentou um aumento da produção de leite de 5,4 kg/dia em relação à produção de leite antes do tratamento dessas vacas.

EXEMPLO 16

Os artigos de somatotropina comprimida foram a partir de 25 mg de uma solução de MBS liofilizada preparada tal como foi descrito no Exemplo 10. O processo de compressão foi semelhante ao do Exemplo 2, exceptuando o facto do molde de compressão ter um diâmetro de 2 mm, da carga aplicada ser de 1.112 newtons (250 libras), e de se

adicionar 1% de estearato de magnésio como lubrificante. Cada um de cinco grupos de 9 vacas Holstein recebeu implantes subcutâneos na região pôscapsular com várias doses e com vários intervalos e um grupo de 9 vacas de controle recebeu implantes simulados de 14 em 14 dias. Durante os 84 dias de estudo, a produção de leite pelas vacas que recebiam 100 mg de 14 em 14 dias excedeu a das vacas de controle em 5,6 kg/dia; a produção das vacas recebendo 200 mg de 14 em 14 dias excedeu a das vacas de controle em 6,4 kg/dia, a produção das vacas recebendo 400 mg de 14 em 14 dias excedeu a das vacas de controle em 7,7 kg/dia e a produção das vacas recebendo 600 mg de 21 em 21 dias excedeu a das vacas de controle em 7,9 Kg/dia.

EXEMPLO 17

Foram preparados dois grupos de artigos comprimidos a partir da solução de MBS liofilizada preparada tal como no Exemplo 10 à qual se adicionou 1% de estearato de magnésio como lubrificante. Os processos de compressão foram semelhantes ao do Exemplo 2, exceptuando o que se segue. Um grupo foi constituído por artigos de 25 mg, com 2 mm de diâmetro que foram comprimidos com uma carga aplicada de 1.112 newtons (250 libras). O segundo grupo foi constituido por artigos de 50 mg, com 4 mm de diâmetro que foram comprimidos com uma carga aplicada de 4.448 newtons (1.000 libras). Um grupo de 10 vacas Holstein recebeu 12 dos artigos com 25 mg (300 mg) de 14 em 14 dias. Um outro grupo de 10 vacas Holstein recebeu 6 artigos de 50 mg (300 mg) de 14 em 14 dias. Um terceiro grupo de 10 vacas de controle recebeu implantes simulados de 14 em 14 dias. Os implantes foram feitos subcutâneamente na região pôscapsular. Durante os 42 dias de

estudo, a produção de leite das vacas que receberam os artigos com 25 mg excedeu a produção das vacas de controlo em 4,2 kg/dia, e a produção das vacas que receberam os artigos de 50 mg excedem a das vacas de controlo em 4,3 kg/dia. Se o primeiro ciclo de implantação for considerado um período de transição entre a condição não tratada e a condição tratada, nos dias 15-42 do estudo os aumentos da produção de leite foram de 5,0 e 5,4 kg/dia em relação às vacas de controlo, para as vacas que receberam artigos de 25 mg e artigos de 50 mg respectivamente.

EXEMPLO 18

A ala-val BST expressa microbiana-mente foi preparada por expressão microbiana do ADN recombinante, substancialmente tal como foi descrito no Exemplo 3a do Requerimento da Patente Europeia, Publicação Nº. 193.515 publicado em 3 de Setembro, 1986, o qual é aqui incorporado como referência. Os corpos refrácteis da ala-val BST foram isolados solubilizados, naturados e purificados tal como foi descrito nos Exemplos 10 e 1 para resultar numa solução liofilizada ala-val BST.

EXEMPLO 19

Foram preparados artigos comprimidos a partir da solução de MBS liofilizada preparada tal como

no Exemplo 10 e a partir da solução de ala-val BST liofilizada preparada tal como no Exemplo 18. Artigos com dois milímetros foram preparados tal como foi descrito no Exemplo 16, incluindo 1% de estearato de magnésio. Cada um de quatro grupos de 9 vacas Holstein recebeu implantes subcutâneos de solução de MBS liofilizada na região pôscapsular nas doses e com os intervalos indicados a seguir. Um grupo de 9 vacas Holstein recebeu implantes subcutâneos de solução de ala-val BST liofilizada na região pôscapsular com uma dose de 250 mg implantada de 14 em 14 dias. Um grupo de 9 vacas recebeu implantes subcutâneos entre as patas trazeiras, a meio caminho entre as tetas e a vulva. Um grupo de 9 vacas de controlo recebeu um implante simulado na região pôscapsular de 14 em 14 dias. Após 42 dias as vacas tratadas revelaram os seguintes aumentos na produção de leite em relação às vacas de controlo: 125 mg de MBS de 14 em 14 dias, um aumento de 3,1 kg/dia; 250 mg de MBS de 14 em 14 dias, um aumento de 4,0 Kg/dia; 250 mg de MBS de 14 em 14 dias, um aumento de 6,6 kg/dia; 250 mg de MBS implantados acima das tetas de 14 em 14 dias, 4,4 kg/dia; 375 mg de MBS de 14 em 14 dias, um aumento de 5,0 kg/dia; e 500 mg de MBS de 21 em 21 dias, um aumento de 5,8 kg/dia. Se o primeiro ciclo de implantação é considerado um período de transição entre a situação não tratada e a situação tratada, os aumentos na produção de leite das vacas tratadas em relação às vacas de controlo excluindo o primeiro ciclo de tratamento foram como se segue: 125 mg de MBS de 14 em 14 dias, um aumento de 3,7 kg/dia; 250 mg de MBS de 14 em 14 dias, um aumento de 4,7 kg/dia; 250 mg de ala-val BST de 14 em 14 dias, um aumento de 7,4 kg/dia; 250 mg de MBS implantados acima das tetas de 14 em 14 dias, um aumento de 5,1 kg/dia; 375 mg de MBS de 14 em 14 dias, um aumento de 5,5 kg/dia; e 500 mg de MBS de 21 em 21 dias, um aumento de 6,4 kg/dia.

EXEMPLO 20

Foram preparados artigos comprimidos a partir de pó de massa de APS e a partir de APS associada a cobre preparados tal como no Exemplo 5. A APS associada a cobre foi produzida usando uma relação molar entre o cobre e a APS de cerca de 2:1. O processo de compressão usado foi na generalidade o descrito no Exemplo 2 exceptuando o facto de se usar 5% de estearato de magnésio como o lubrificante. Uma quantidade suficiente da formulação de somatotropina para dar origem a doses de 60 mg e de 90 mg foi colocada num molde de 2,4 mm ou de 3,2 mm e comprimida com uma carga aplicada de 4.448 newtons (1.000 libras). Estes artigos foram implantados na gordura (tecido adiposo) da parte posterior do pescoço de 10 porcos de raça cruzada do tipo comercial com intervalos de 14 e de 21 dias. O estudo durou 42 dias. Foram determinados durante um período de 42 dias ADG, FE e % de melhoria da eficiência alimentar. Os resultados são indicados no Quadro VI, em comparação com um controlo negativo que não recebeu somatotropina e com um controlo positivo que recebeu uma injeção diária de 2 mg de APS em solução. Os dados indicam uma libertação prolongada eficaz de cerca de 1 semana, com a esperada redução da eficiência alimentar quando termina o período de libertação. Todos os sistemas de implantação ao longo da totalidade das 6 semanas de estudo melhoraram a eficiência alimentar em relação ao controlo negativo e sobretudo revelaram uma eficiência alimentar aproximadamente equivalente à do controlo positivo com injeção diárias.

QUADRO VI

	Controlo- (sem tra- tamento)	Controlo+ (2mg/ dia)	Dose: Intervalo: Diam:	APS			Cu APS		
				90mg 3 Sem. 3 mm	60mg 2 Sem. 3 mm	90mg 2 Sem. 3 mm	60mg 2 Sem. 2 mm	90mg 3 Sem. 3 mm	60mg 2 Sem. 3 mm
Semana 1									
ADG(kg/dia)	,99	1,33		1,03	1,05	1,17	1,14	1,12	1,16
FE(alimento/ganho)	3,40	2,73		2,99	2,81	2,69	2,71	2,21	2,34
Semana 2									
ADG(kg/dia)	,98	,99		,78	,80	,75	,70	,62	,65
FE(alimento/ganho)	3,84	3,72		4,57	4,46	4,50	5,25	5,21	4,96
Semana 3									
ADG(kg/dia)	,99	1,13		,82	1,01	1,16	1,19	,92	1,26
FE(alimento/ganho)	3,83	3,16		4,00	2,84	2,76	3,05	3,90	2,58
Semana 4									
ADG(kg/dia)	,84	1,01		1,28	,95	,70	,82	1,23	,71
FE(alimento/ganho)	4,62	3,74		3,20	4,16	5,27	4,72	2,60	5,21
Semana 5									
ADG(kg/dia)	,79	1,03		,97	,93	1,04	1,05	,69	1,17
FE(alimento/ganho)	4,34	3,78		3,94	3,70	3,39	3,64	6,08	3,16
Semana 6									
ADG(kg/dia)	1,00	1,19		,78	,99	1,06	1,03	,87	,82
FE(alimento/ganho)	3,88	3,43		5,87	3,75	3,83	3,84	4,75	4,84
Semanas 1-6									
ADG(kg/dia)	,93	1,11		,95	,96	,98	,99	,91	,96
FE	3,98	3,34		3,82	3,43	3,45	3,58	3,54	3,45
% Aum. FE	--	--		4,0%	13,8%	13,3%	10,1%	11,1%	13,3%

11-43-

EXEMPLO 21

Os artigos comprimidos foram preparados a partir de pó de massa de APS e de APS associado a cobre (relação molar 2:1 entre o cobre e o APS) tendo 5% de estearato de magnésio como lubrificante, tal como no Exemplo 2, exceptuando o que for indicado a seguir. Os artigos comprimidos foram preparados com tamanhos de 60 mg e de 30 mg, com 3,2 mm de diâmetro comprimidos com aplicação de uma carga de 4.448 newtons (1.000 libras) e com 4 mm de diâmetro com aplicação de uma carga de 8,895 newtons (2.000 libras). Os artigos com 4 mm de diâmetro apresentavam uma altura aproximadamente igual à do seu diâmetro, de modo a minimizar a área da superfície do cilindro. Um grupo de artigos com 60 mg, 3,2 mm e um grupo de artigos com 30 mg, 3,2 mm foram colocados em tubagem silástica esticada de 2 mm, sem revestimento nas extremidades. Foram implantadas doses de 60 mg em porcos de raça cruzada do tipo comercial, na gordura (tecido adiposo) da parte posterior do pescoço, com um intervalo de 4 semanas. Os resultados durante um período de 5 semanas são indicados no Quadro VII, em comparação com os porcos de controlo que não receberam somatotropina. Os resultados dos dois grupos de porcos que receberam os implantes com tubagem silástica demonstram manipulação da performance (actuação) por manipulação do tamanho da superfície de libertação. Os porcos que receberam 2 dos artigos com 30 mg melhoraram a sua performance (actuação) em relação aos porcos que receberam 1 dos artigos de 60 mg. Visto terem extremidades abertas, os implantes de artigos com 30 mg tinham uma superfície de libertação duas vezes maior do que os artigos de 60 mg, resultando numa performance (actuação) melhorada.

QUADRO VII

CONTROLO	Tipo: Dose: Diam:	APS 60mg 3mm	APS 60mg 4mm	Cu 60mg 4mm	Cu* 60mg 3mm	Cu* 2-30mg 3mm
Semana 1						
ADG(kg/dia)	,84	1,03	0,94	,82	,93	0,83
FE(alimento/ganho)	4,23	2,53	3,14	3,58	3,33	3,53
Semana 2						
ADG(kg/dia)	,95	,63	,69	,73	,65	,64
FE(alimento/ganho)	3,69	4,44	4,64	4,08	4,92	9,79
Semana 3						
ADG(kg/dia)	1,02	1,05	,76	,92	,81	,75
FE(alimento/ganho)	3,66	3,50	4,09	3,44	4,19	3,97
Semana 4						
ADG(kg/dia)	,72	,87	,89	,74	,74	,84
FE(alimento/ganho)	5,35	3,92	3,84	4,42	4,29	3,90
Semana 5						
ADG(kg/dia)	,83	,82	,78	,99	,78	,99
FE(alimento/ganho)	5,58	4,15	3,89	3,15	4,16	3,30
Semanas 1-5						
ADG(kg/dia)	,87	,88	,81	,84	,78	,81
FE(alimento/ganho)	3,90	3,53	3,65	3,55	3,98	3,65
% Aum. FE	--	9,5%	6,4%	9,0%	--	6,4%

* em tubagem si-
lástica

EXEMPLO 22

A APS associada ao cobre foi preparada dissolvendo pó de massa de APS preparado tal como no Exemplo 5 em água desionizada a 60 mg/ml. Adicionou-se uma quantidade suficiente de CuSO_4 100 mM para se conseguir a desejada relação molar Cu:APS. O pH ajustado para 7 pela adição de ácido sulfúrico para precipitar a somatotropina. O precipitado foi isolado e liofilizado. Foram preparados artigos comprimidos a partir destas somatotropinas associadas ao cobre tendo as relações molares Cu:APS indicadas. O processo de compressão usado foi na generalidade o descrito no Exemplo 2, exceptuando o facto do diâmetro ter 3,2 mm, de se adicionar 5% de estearato de magnésio como um lubrificante, da carga aplicada ser de 4.448 newtons (1.000 libras), e de se utilizar 60 mg e 30 mg de somatotropina, tal como foi indicado. Estes artigos foram implantados de 14 em 14 dias na gordura (tecido adiposo) da parte posterior do pescoço em grupos de 10 porcos. Os porcos foram monitorizados durante um período de estudo de 6 semanas e os resultados são indicados no Quadro VIII, em comparação com um controlo negativo que não recebeu somatotropina e com um controlo positivo que recebeu uma injeção diária de APS em solução. A duração eficaz de cada um dos tratamentos variou, mas os tratamentos contendo as taxas mais baixas de cobre apresentaram uma duração eficaz mais longa do que os tratamentos com taxas mais elevadas.

QUADRO VIII

	Control- (sem tratamento)	Control+ (2mg/dia)	Dose: Cu:APS:	60mg 1:1	60mg 2:1	2x30mg 1:1	2x30mg 2:1	2x30mg 1.5:1
Semana 1								
ADG(kg/dia)	1,00	1,05		1,05	1,01	,99	,89	,92
FE(alimento/ganho)	2,83	2,73		2,57	3,08	2,97	2,90	2,95
Semana 2								
ADG(kg/dia)	,79	,98		,86	,69	,81	,87	,92
FE(alimento/ganho)	4,24	2,97		3,73	4,64	3,72	3,33	3,19
Semana 3								
ADG(kg/dia)	,95	1,02		1,05	1,21	,91	1,00	1,07
FE(alimento/ganho)	3,36	2,76		2,35	2,41	2,87	2,84	2,66
Semana 4								
ADG(kg/dia)	,99	1,13		,64	,70	,93	1,01	,81
FE(alimento/ganho)	3,28	2,75		4,69	6,71	3,32	3,24	3,90
Semana 5								
ADG(kg/dia)	,81	,97		1,13	1,11	1,05	,99	1,00
FE(alimento/ganho)	3,90	3,15		2,40	2,95	2,58	3,16	2,94
Semana 6								
ADG(kg/dia)	,75	,68		,69	,69	,29	,63	,38
FE(alimento/ganho)	4,23	4,16		5,86	5,03	7,05	5,69	4,72
Semanas 1-6								
ADG(kg/dia)	,88	,97		,91	,90	,83	,90	,85
FE(alimento/ganho)	3,43	2,85		2,88	3,31	3,17	3,23	3,38
% Aum. FE	--	--		16,0%	3,5%	7,6%	5,8%	1,5%

47-

EXEMPLO 23

Foram produzidos artigos comprimidos a partir de pó de massa de APS produzido no Exemplo 5, misturados a seco com uma quantidade suficiente de CuSO_4 para dar origem à relação molar entre Cu e APS e a partir da APS associada ao cobre precipitada com a relação molar indicada entre Cu e APS. O processo de compressão foi geralmente tal como foi descrito no Exemplo 2, exceptuando o facto de se adicionar 5% de estearato de magnésio como lubrificante, e de a carga aplicada ser ou de 1.000 newtons (225 libras) ou de 2.224 newtons (500 libras), tal como foi indicado. Os artigos implantados quer se manualmente quer de 2 em 2 semanas, tal como foi indicado, em grupos de 10 porcos de raça cruzada do tipo comercial na gordura (tecido adiposo) da parte posterior do pescoço. Os resultados do estudo são indicados no Quadro IX a seguir.

QUADRO IX

<u>Tratamento*:</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
Semana 1							
ADG (kg/dia	.93	1,24	1,00	1,24	1,13	1,19	1,19
FE (alimento/ ganho)	3,05	2,31	2,71	2,42	2,44	2,34	2,34
Semana 2							
ADG (kg/dia)	,89	1,11	,88	1,05	,91	,95	,84
FE (alimento/ ganho)	4,19	2,76	3,28	3,17	3,60	3,17	3,62
Semana 3							
ADG (kg/dia)	,93	1,13	,97	1,09	1,14	1,20	1,04
FE (alimento/ ganho)	3,99	2,96	3,32	3,19	3,06	2,70	3,36
Semana 4							
ADG (kg/dia)	1,00	1,21	1,09	1,11	1,08	1,02	,94
FE (alimento/ ganho)	3,31	2,83	3,08	3,40	3,27	3,62	3,83
Semana 5							
ADG (kg/dia)	1,02	1,18	1,12	1,21	1,02	1,08	1,30
FE (alimento/ ganho)	3,54	3,11	3,08	3,08	3,37	3,12	2,68
Semana 6							
ADG (kg/dia)	,69	,98	,75	1,01	,73	1,01	,63
FE (alimento/ ganho)	5,29	4,89	4,47	4,18	6,00	4,43	7,06
Semana 1-6							
ADG (kg/dia)	,91	1,14	,97	1,12	1,00	1,08	,99
FE (alimento/ ganho)	3,63	2,93	3,23	3,15	3,35	3,07	3,32
% Aum. FE	--	--	11,0%	13,2%	7,7%	15,4%	8,5%

*Tratamento 1 - controle negativo, não receberam somatotropina

Tratamento 2 - controle positivo, receberam 2 mg/dia de APS em solução

Tratamento 3 - 21 mg de APS administrados semanalmente, sem Cu, diâmetro de 2,4 mm, 1.000 newtons (225 libras)

Tratamento 4 - 21 mg de APS administrados semanalmente, mistura a seco, relação 2:1 de Cu:APS, diâmetro de 2,4 mm, 1.000 newtons (225 libras)

Tratamento 5 - 42 mg de APS administrados bi-semanalmente, mistura a seco, relação 4:1 de Cu:APS, diâmetro de 3,2 mm, 2.224 newtons (500 libras)

Tratamento 6 - 60 mg de APS administrados bi-semanalmente, precipitado, relação de 1:1 de Cu:APS, diâmetro de 3,2, 2.224 newtons (500 libras)

Tratamento 7 - 42 mg de APS administrados bi-semanalmente, precipitado, relação 1:1 de Cu:APS, 3 mm de diâmetro, 2.224 newtons (500 libras)

EXEMPLO 24

Foram preparados artigos comprimidos a partir de APS associada com cobre precipitada, com uma relação molar 1:1 de Cu:APS, preparados tal como no Exemplo 5 e a partir de uma mistura a seco de CuSO_4 e pó de massa de APS com uma relação molar 4:1 de Cu:APS. O processo de compressão usado foi na generalidade o do Exemplo 2, exceptuando o facto dos artigos compactos conterem 14 mg e 21 mg de somatotropina, terem 2,4 de diâmetro, conterem 5% de lubrificante estearato de magnésio, e de serem comprimidos com a aplicação de uma carga de 1.000 newtons (225 libras). A implantação foi semanal, a grupos de 10 porcos de raça cruzada do tipo comercial, na gordura (tecido adiposo) da parte posterior do pescoço. Os resultados são indicados no Quadro X, comparados com um controlo negativo que não recebeu somatotropina e com um controlo positivo que recebeu 2 mg/dia de APS administrada como uma solução.

QUADRO X

	Controlo- (sem tratamento)	Controlo+ (2mg/dia)	Tipo Relação Cu:APS		: Precip 1:1 14mg		Mistura a seco Mistura a Seco	
			Dose				4:1 21mg	4:1 14mg
Semana 1								
ADG(kg/dia)	1,23	1,15			1,03		1,06	1,21
FE(alimento/ganho)	2,44	2,32			2,74		2,49	2,32
Semana 2								
ADG(kg/dia)	1,08	1,00			,91		,83	,93
FE(alimento/ganho)	3,30	3,16			3,15		3,52	3,44
Semana 3								
ADG(kg/dia)	1,02	1,05			,96		1,01	1,00
FE(alimento/ganho)	3,47	2,64			3,11		2,54	3,22
Semana 4								
ADG(kg/dia)	1,05	,99			,84		,79	,82
FE(alimento/ganho)	3,62	3,15			4,02		3,89	4,34
Semana 5								
ADG(kg/dia)	,78	,86			,99		,75	,84
FE(alimento/ganho)	5,22	3,49			3,62		4,10	4,01
Semana 6								
ADG(kg/dia)	,78	1,27			,88		,99	1,02
FE(alimento/ganho)	6,45	3,32			4,25		4,95	3,95
Semanas 1-6								
ADG	,99	1,05			,93		,90	,97
FE(alimento/ganho)	3,56	2,73			3,30		3,17	3,28
% Aum. FE	--	--			7,3%		11,0%	7,9%

-52-

EXEMPLO 25

Foram preparados artigos comprimidos a partir de uma mistura a seco de pó de massa de APS e CuSO_4 (relação molar 2:1 de Cu:APS) e a partir de APS associado com cobre que foi preparada por liofilização de uma solução de APS e CuSO_4 tendo uma relação molar 1:1 de Cu:APS. O processo foi na generalidade o do Exemplo 2, exceptuando o facto do diâmetro ter 2,4 mm, de se adicionar 5% de estearato de magnésio como um lubrificante, da carga aplicada ser de 1.000 newtons (225 libras), e de se utilizar 21 mg de somatotropina por dose. As implantações foram realizadas semanalmente durante 4 semanas em grupos de 10 porcos de raça cruzada do tipo comercial na gordura (tecido adiposo) da parte posterior do pescoço. Os resultados são indicados no Quadro XI, comparados com um grupo de porcos de controlo negativo que não receberam somatotropina e um grupo de porcos de controlo positivo que receberam 2 mg/dia de APS em solução. A solução liofilizada apresentava uma relação molar 1:1 de cobre: APS associado e a mistura a seco uma relação molar 2:1 realizada substancialmente de um modo equivalente.

QUADRO XI

	<u>Controlo -</u> <u>(sem tratamento)</u>	<u>Contolo +</u> <u>(2 mg/dia)</u>	<u>Solução</u> <u>lioofilizada</u>	<u>Mistura</u> <u>a seco</u>
Semana 1				
ADG (kg/dia)	1,04	1,32	,91	1,26
FE (alimento/ganho)	2,88	1,99	2,79	2,10
Semana 2				
ADG (Kg/dia)	,79	1,04	,90	,79
FE (alimento/ganho)	4,09	2,84	3,22	3,59
Semana 3				
ADG (kg/dia)	1,09	1,26	,99	,96
FE (alimento/ganho)	3,18	2,47	3,16	3,26
Semana 4				
ADG (kg/dia)	,76	,59	,86	,77
FE (alimento/ganho)	4,86	3,50	3,73	3,84
Semanas 1-4				
ADG (kg/dia)	,92	1,05	,91	,94
FE (alimento/ganho)	3,43	2,77	3,05	3,05
% Imp. FE	--	--	11,1%	11,1%

EXEMPLO 26

Os artigos comprimidos foram produzidos usando uma mistura a seco de CuSO_4 e pó de massa de APS, com as relações molares e doses indicadas. O processo de compressão foi na generalidade o do Exemplo 2, exceptuando o facto de se adicionar 5% de estearato de magnésio como lubrificante, de se usar um molde de 2,4 mm e da força aplicada ser de 1.000 newtons (225 libras). Estes artigos comprimidos foram implantados semanalmente, durante um período de 6 semanas a grupos de 10 porcos de raça cruzada do tipo comercial na parte posterior do pescoço, logo atrás da orelha. Os resultados do estudo são indicados no Quadro XII a seguir, comparados com um grupo de controlo negativo que não recebeu somatotropina e com um grupo de controlo positivo que recebeu 2 mg/dia de APS administrado como uma solução.

QUADRO XII

	Control- (sem tratamento)	Controlo+ (2mg/dia)	Relação Dose:	1:1					2:1					3:1					2:1										
				21mg					21mg					21mg					17mg					25mg					
Semana 1																													
ADG(kg/dia)	,93	1,03		1,02					1,08					1,01					,98				1,09			1,14			
FE(alimento/ganho)	3,79	3,58		3,29					3,11					3,51					3,30				3,68			3,23			
Semana 2																													
ADG(kg/dia)	1,00	1,20		,98					1,09					1,10					,92				1,13			1,06			
FE(alimento/ganho)	3,88	3,25		3,49					3,30					3,19					3,82				3,11			3,46			
Semana 3																													
ADG(kg/dia)	,81	,94		,94					,79					,93					,92				,97			1,01			
FE(alimento/ganho)	4,71	3,97		3,54					4,02					3,75					3,76				3,63			3,72			
Semana 4																													
ADG(kg/dia)	,86	1,01		,95					,90					1,01					,97				,93			,89			
FE(alimento/ganho)	4,56	3,72		3,73					3,96					3,43					3,82				3,87			7,06			
Semana 5																													
ADG(kg/dia)	,79	1,02		1,05					1,05					,94					,84				,92			1,00			
FE(alimento/ganho)	5,11	3,56		3,61					3,75					3,98					4,63				4,23			4,16			
Semana 6																													
ADG(kg/dia)	,87	1,06		,99					1,03					1,17					,97				1,23			1,09			
FE(alimento/ganho)	4,55	3,73		3,94					3,56					3,51					3,95				3,46			3,73			
Semanas 1-6																													
ADG(kg/dia)	,88	1,04		,99					,99					1,03					,93				1,05			1,03			
FE(alimento/ganho)	4,29	3,56		3,52					3,45					3,46					3,76				3,53			3,71			
% Aum. FE	--	--		17,9%					19,6%					19,3%					12,4%				17,7%			13,5%			

-56-

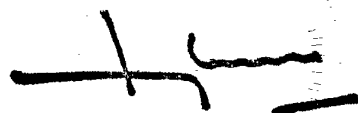
EXEMPLO 27

Foram produzidos artigos comprimidos a partir de uma mistura a seco de CuSO_4 e o pó da massa de APS, com uma relação molar de Cu:APS. O processo de compressão foi na generalidade o do Exemplo 2, exceptuando o facto de se adicionar como lubrificante, tal como foi indicado, 5% de estearato de magnésio ou 1% de estearato de magnésio, da carga aplicada ser de 1.000 newtons (225 libras) e do diâmetro ser de 2,4 mm. Foram feitas implantações de 21 mg por semana durante 6 semanas a um grupo de 10 porcos de raça cruzada do tipo comercial no pescoço, directamente atrás da orelha. Os resultados são indicados no Quadro XIII, comparados com um grupo de porcos de controlo negativo que não receberam somatotropina e comparados com um grupo de porcos de controlo positivo que receberam 2 mg de APS por dia, administrados como uma solução. Ao longo do período de 6 semanas de estudo, os tratamentos com 1% de estearato de magnésio e com 5% de estearato de magnésio e com 5% de estearato de magnésio apresentaram resultados semelhantes.

QUADRO XIII

	<u>Controlo -</u> <u>(sem tratamento)</u>	<u>Controlo +</u> <u>(mg/dia)</u>	<u>5% de</u> <u>MgSt</u>	<u>1% de</u> <u>MgSt</u>
Semana 1				
ADG (kg/dia)	1,19	1,41	1,26	1,20
FE (alimento/ganho)	2,48	2,10	2,31	2,36
Semana 2				
ADG (kg/dia)	,92	,97	,86	,92
FE (alimento/ganho)	3,87	3,27	3,91	4,61
Semana 3				
ADG (kg/dia)	,92	1,03	,99	,99
FE (alimento/ganho)	4,28	2,93	3,23	6,02
Semana 4				
ADG (kg/dia)	,72	1,13	,85	,96
FE (alimento/ganho)	3,96	3,07	3,88	3,51
Semana 5				
ADG (kg/dia)	,81	1,05	1,03	,80
FE (alimento/ganho)	5,05	3,52	3,46	4,31
Semana 6				
ADG (kg/dia)	,83	,96	,86	1,03
FE (alimento/ganho)	4,52	3,83	4,28	3,66
Semanas 1-6				
ADG (kg/dia)	,90	1,09	,97	,94
FE (alimento/ganho)	3,80	2,99	3,27	3,28
% Aum. FE	--	--	13,9%	13,9%

Os Exemplos anteriores são ilustrativos mas não pretendem ser limitativos.



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1a. - Processo para a produção de um artigo moldado adaptado para administração parentérica de uma somatotropina a um animal caracterizado por se incluir no referido artigo uma dose eficaz de uma somatotropina sólida de modo a obter-se um artigo que se apresenta essencialmente livre de agente de ligação, essencialmente livre de matriz, que tem pelo menos uma superfície de libertação não revestida, sendo a gama de concentração de uma somatotropina, no referido artigo moldado, de 70 a 100 por cento".

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se incluir ainda no referido artigo uma quantidade eficaz de um agente de lubrificação.

3a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a somatotropina ser uma somatotropina expressa microbianamente.

4a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a somatotropina ser selecionada a partir do grupo que consiste em somatotropina bovina e somatotropina porcina.

5a. - Processo de acordo com a reivindicação 4 caracterizado por a somatotropina ser somatotropina bovina expressa microbianamente.

6a. - Processo de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por a somatotropina bovina expressa microbianamente ser metionil-somatotropina bovina (MBS).

7a. - Processo de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por a somatotropina bovina expressa microbianamente ser alanil-valil-somatotropina bovina (alanil-val BST).

8a. - Processo de acordo com a reivindicação 4 caracterizado por a somatotropina ser somatotropina porcina expressa microbianamente.

9a. - Processo de acordo com a reivindicação 8 caracterizado por a somatotropina porcina expressa microbianamente ser alanil-somatotropina porcina (APS).

10a. - Processo de acordo com a reivindicação 8 caracterizado por a somatotropina porcina expressa microbianamente ser somatotropina porcina associada com cobre ou uma mistura seca de um sal de cobre e de uma somatotropina porcina.

11a. - Processo de acordo com a reivindicação 10 caracterizado por se obter um artigo que apresenta um conteúdo de cobre entre cerca de 0,1 e cerca de 3%.

12a. - Processo para a produção de um artigo moldado adaptado para administração parentérica de uma somatotropina a um animal, caracterizado por a. se incluir no referido artigo uma dose eficaz de uma somatotropina sólida, seleccionada entre o grupo consistindo em somatotropina bovina e porcina expressa microbianamente; b. se incluir facultativamente, no referido artigo uma quantidade eficaz de um agente de lubrificação; e c. se obter um artigo essencialmente livre de agente de ligação, essencialmente livre de matriz, e com menos uma superfície de libertação não revestida.

13a. - Processo de acordo com a reivindicação 12 caracterizado por o agente de lubrificação ser seleccionado entre o grupo consistindo em estearatos e palmitatos.

14a. - Processo de acordo com a reivindicação 12 caracterizado por a somatotropina expressa microbianamente ser somatotropina bovina.

15a. - Processo de acordo com a reivindicação 14 caracterizado por a somatotropina bovina expressa microbianamente ser MBS.

16a. - Processo de acordo com a reivindicação 14 caracterizado por a somatotropina bovina expressa microbianamente ser ala-val BST.

17a. - Processo de acordo com a reivindicação 12 caracterizado por a somatotropina expressa microbianamente ser uma somatotropina porcina.

18a. - Processo de acordo com a reivindicação 17 caracterizado por a somatotropina porcina expressa microbianamente ser APS.

19a. - Processo de acordo com a reivindicação 17 caracterizado por a somatotropina porcina expressa microbianamente ser uma somatotropina porcina associada com cobre ou uma mistura seca de um sal de cobre e de uma somatotropina porcina.

20a. - Processo para a produção de um artigo moldado adaptado para administração parentérica de uma somatotropina a um animal caracterizado por se incluir, essencialmente, no referido artigo: a. uma dose eficaz de uma somatotropina sólida; b. facultativamente, uma quantidade eficaz de um lubrificante; e c. facultativamente, um revestimento numa ou mais superfícies do artigo, o qual inibe substancialmente a libertação da somatotropina a partir das superfícies revestidas, mas com pelo menos uma superfície de libertação não revestida.

21a. - Processo de acordo com a reivindicação 20 caracterizado por a somatotropina ser uma somatotropina expressa microbianamente.

22a. - Processo de acordo com a reivindicação 20 caracterizado por a somatotropina ser selecionada entre o grupo consistindo em somatotropina bovina e somatotropina porcina.

23a. - Processo de acordo com a reivindicação 20 caracterizado por a somatotropina ser somatotropina bovina expressa microbianamente.

24a. - Processo de acordo com a reivindicação 23 caracterizado por a somatotropina bovina expressa microbianamente ser MBS.

25a. - Processo de acordo com a reivindicação 23 caracterizado por a somatotropina bovina expressa microbianamente ser ala-val BST.

26a. - Processo de acordo com a rei
vindicação 22 caracterizado por a somatotropina ser somatotoro
pina porcina expressa microbianamente.

27a. - Processo de acordo com a rei
vindicação 26 caracterizado por a somatotropina porcina ex-
pressa microbianamente ser APS.

28a. - Processo de acordo com a rei
vindicação 26 caracterizado por a somatotropina porcina ex-
pressa microbianamente ser somatotropina porcina associada
com cobre ou uma mistura seca de um sal de cobre e de uma so-
matotropina porcina.

29a. - Processo de acordo com a rei
vindicação 28 caracterizado por ter um conteúdo de cobre de
cerca de 0,1% a cerca de 3%.

30a. - Método para administração
prolongada de somatotropina a um animal, caracterizado por
compreender a implantação parentérica de um artigo moldado
compreendendo uma dose eficaz de uma somatotropina sólida, o
qual se apresenta essencialmente livre de agente de ligação,
essencialmente livre de matriz e tem pelo menos uma superfi-
cie de libertação não revestida, estando a gama de dosagem
eficaz compreendida entre cerca de 5 mg e cerca de 1500 mg.

31a. - Método de acordo com a rei
vindicação 30 caracterizado por a somatotropina ser somato-
tropina expressa microbianamente.

32ª. - Método de acordo com a reivindicação 31 caracterizado por a somatotropina expressa microbianamente ser somatotropina bovina.

33ª. - Método de acordo com a reivindicação 32 caracterizado por a somatotropina bovina expressa microbianamente ser MBS.

34ª. - Método de acordo com a reivindicação 32 caracterizado por a somatotropina bovina expressa microbianamente ser ala-val BST.

35ª. - Método de acordo com a reivindicação 31 caracterizado por a somatotropina expressa microbianamente ser somatotropina porcina.

36ª. - Método de acordo com a reivindicação 35 caracterizado por a somatotropina porcina expressa microbianamente ser APS.

37ª. - Método de acordo com a reivindicação 35 caracterizado por a somatotropina porcina ser somatotropina porcina associada com cobre ou uma mistura seca de sal de cobre e de uma somatotropina porcina.

38ª. - Método de acordo com a reivindicação 37 caracterizado por o artigo moldado ter um conteúdo de cobre entre cerca de 0,1% e cerca de 3%.

39ª. - Método de administração prolongada de uma somatotropina a um animal caracterizado por compreender a implantação parentérico de um artigo moldado que: a. compreende uma dose eficaz de uma somatotropina sólida seleccionada entre o grupo consistindo em somatotropina bovina e porcina expressa microbianamente; b. compreende facultativamente, uma quantidade eficaz de um agente de lubrificação; c. compreende facultativamente um revestimento numa ou mais superfícies do artigo, o qual inibe substancialmente a libertação da somatotropina a partir das superfícies revestidas; e d. apresenta-se substancialmente livre de agente de ligação, essencialmente livre de matriz e tem pelo menos uma superfície de libertação não revestida; estando a gama de dosagem eficaz compreendida entre cerca de 5 mg e cerca de 1500 mg.

40ª. - Método para administração prolongada de uma somatotropina a um animal, caracterizado por compreender a implantação parentérica de um artigo moldado constituído essencialmente por: a. uma dose eficaz de uma somatotropina sólida; b. facultativamente, uma quantidade eficaz de um agente de lubrificação; e c. facultativamente, um revestimento numa ou mais superfícies do artigo, o qual inibe substancialmente a libertação da somatotropina das superfícies revestidas, mas com pelo menos uma superfície não revestida; estando a gama de dosagem eficaz compreendida entre cerca de 5 mg e cerca de 1500 mg.

41ª. - Método de acordo com a reivindicação 40 caracterizado por a somatotropina ser uma somatotropina expressa microbianamente.

42ª. - Método de acordo com a reivindicação 41 caracterizado por a somatotropina expressa microbianamente ser somatotropina bovina.

43ª. - Método de acordo com a reivindicação 42 caracterizado por a somatotropina bovina ser MBS.

44ª. - Método de acordo com a reivindicação 42 caracterizado por a somatotropina bovina expressa microbianamente ser ala-val BST.

45ª. - Método de acordo com a reivindicação 41 caracterizado por a somatotropina expressa microbianamente ser somatotropina porcina.

46ª. - Método de acordo com a reivindicação 45 caracterizado por a somatotropina expressa microbianamente ser APS.

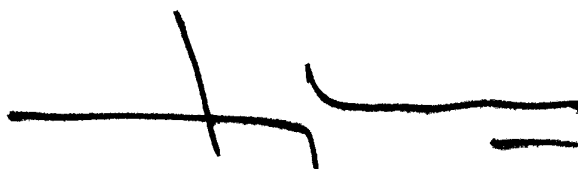
47ª. - Método de acordo com a reivindicação 45 caracterizado por a somatotropina porcina ser somatotropina associada com cobre ou uma mistura seca de um sal de cobre e de uma somatotropina porcina.

48ª. - Método de acordo com a reivindicação 47 caracterizado por o artigo moldado ter um conteúdo de cobre entre cerca de 0,1% e cerca de 3%.

49ª. - Método de administração prolongada de uma somatotropina a um animal caracterizado por compreender a implatação parentérica de um artigo moldado constituído essencialmente por: a. uma dose eficaz de uma somatotropina sólida seleccionada entre o grupo consistindo em somatotropina bovina e porcina expressa microbianamente;

b. facultativamente, uma quantidade eficaz de um agente de lubrificação; e c. facultativamente, um revestimento numa ou mais superfícies do artigo, o qual inibe substancialmente a libertação da somatotropina das superfícies revestidas, mas com pelo menos uma superfície de libertação não revestida.

Lisboa, 15 de Março de 1988

A handwritten signature in black ink, consisting of a horizontal line with a vertical stroke crossing it, followed by a series of loops and a final horizontal stroke.

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

1/3

PRODUÇÃO DE LEITE DE VACAS TRATADAS E DE CONTROLO
(TESTEMUNHAS) NO EXEMPLO 2

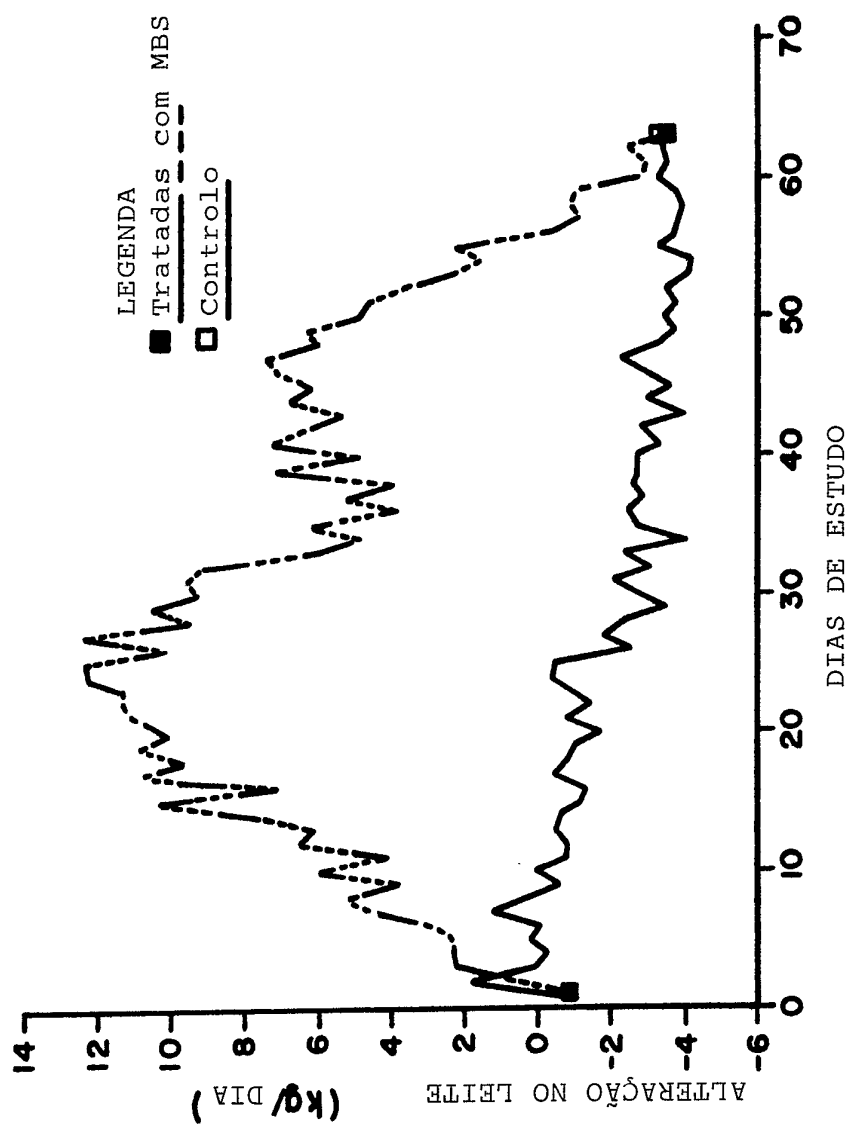


FIG.1.

2/3

CONCENTRAÇÃO DA SOMATOTROPINA DO SORO DE VACAS LEITEIRAS
TRATADAS E DE CONTROLO (TESTEMUNHAS) NO EXEMPLO 2

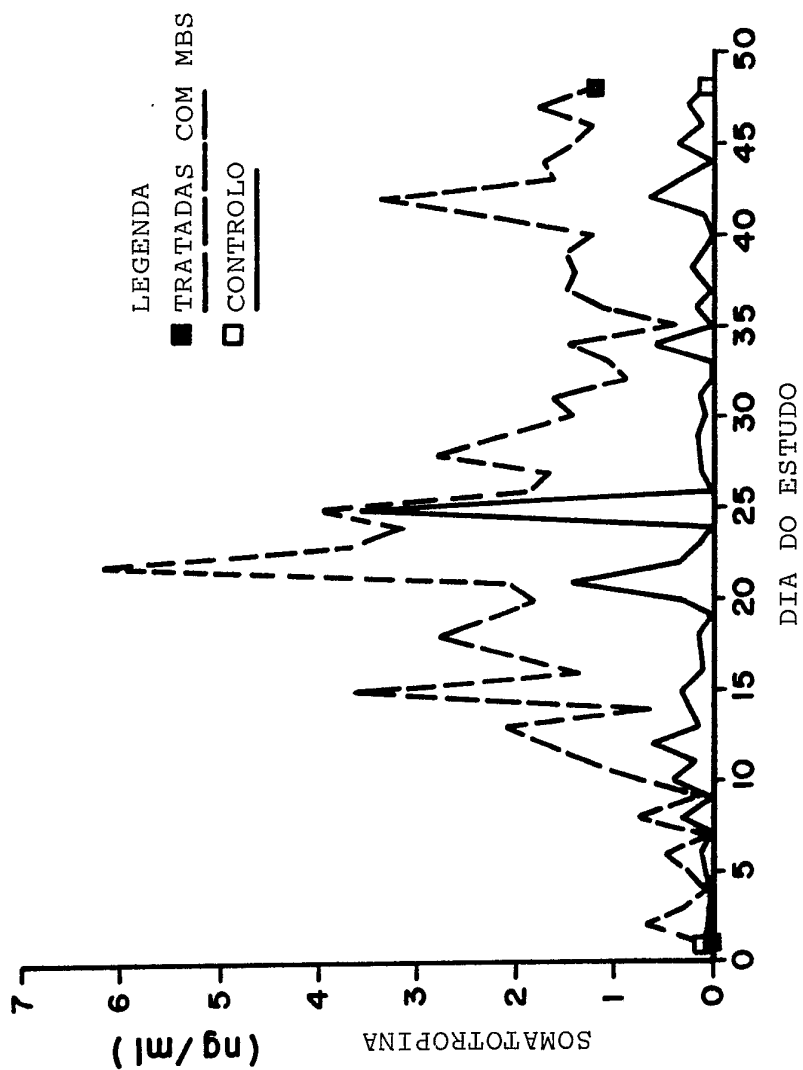


FIG. 2.

Handwritten signature or initials.

3/3

CONCENTRAÇÃO DA SOMATOTROPINA DO SORO DE VACAS NÃO
LEITEIRAS TRATADAS COM MBS NO EXEMPLO 3

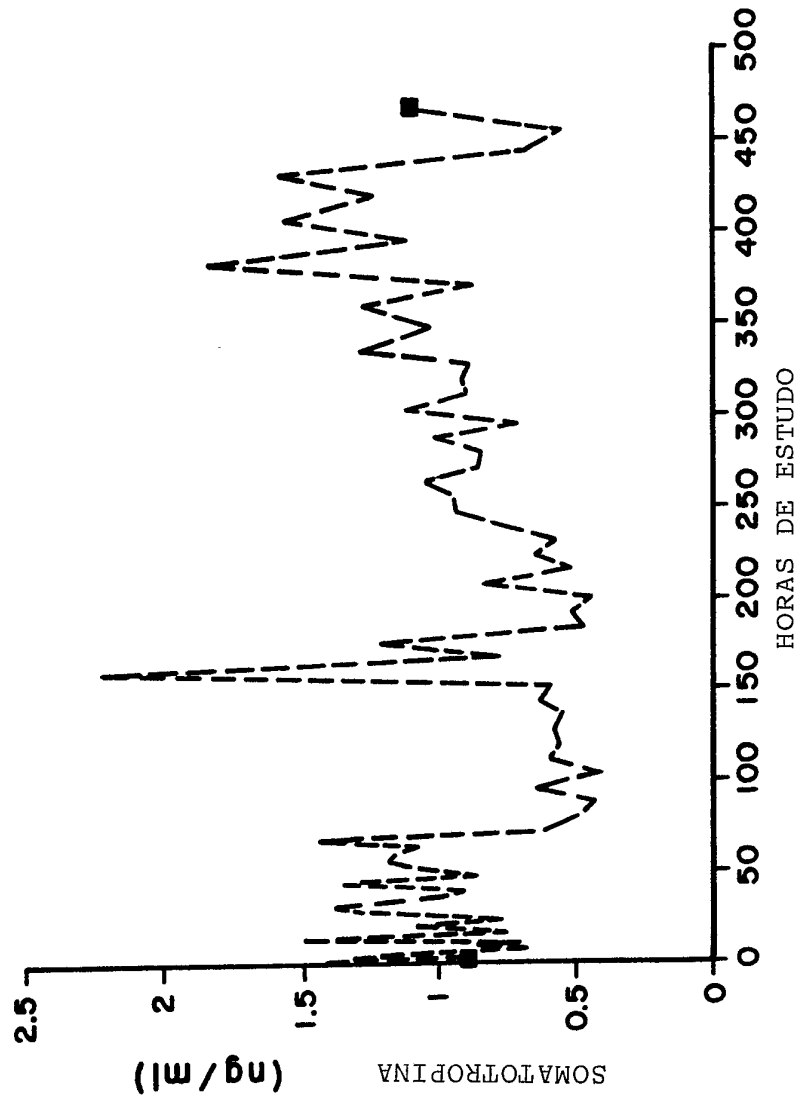


FIG. 3.