

(11) Número de Publicação: **PT 1651249 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 38/23** (2011.01) **A61K 9/20** (2011.01)  
**A61K 47/16** (2011.01) **A61P 19/08** (2011.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2004.07.22</b>	(73) Titular(es): <b>NOVARTIS AG</b> <b>LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL</b> <b>NORDIC BIOSCIENCE A/S</b>	<b>CH</b> <b>DK</b>
(30) Prioridade(s): <b>2003.07.23 US 489400 P</b>		
(43) Data de publicação do pedido: <b>2006.05.03</b>	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2012.09.12</b> <b>246/2012</b>	<b>SIMON DAVID BATEMAN</b> <b>MOISE AZRIA</b> <b>SHOUFENG LI</b> <b>CLAUS CHRISTIANSEN</b>	<b>US</b> <b>CH</b> <b>US</b> <b>DK</b>
	(74) Mandatário: <b>LUÍS MANUEL DE ALMADA DA SILVA CARVALHO</b> <b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **USO DE CALCITONINA EM OSTEOARTRITE**

(57) Resumo:

A RESENTE INVENÇÃO DIZ RESPEITO A UMA NOVA UTILIZAÇÃO DA CALCITONINA EM OSTEOARTRITE E A MÉTODOS DE TRATAMENTO E /OU PREVENÇÃO DE OSTEOARTRITE EM MAMÍFEROS, PARTICULARMENTE EM HUMANOS.

**RESUMO**

**"USO DE CALCITONINA EM OSTEOARTRITE"**

A presente injeção diz respeito a uma nova utilização da calcitonina em osteoartrite e a métodos de tratamento e /ou prevenção de osteoartrite em mamíferos, particularmente em humanos.

**DESCRIÇÃO****"USO DE CALCITONINA EM OSTEOARTRITE"**

A presente invenção refere-se a um novo uso de calcitonina em métodos de tratamento e/ou prevenção de osteoartrite em mamíferos, particularmente em seres humanos.

As calcitoninas, por exemplo, calcitonina de salmão (Asu 1-7)-enguia ou calcitonina humana, da invenção, são compostos que são hormonas de polipeptídeo de cadeia longa segregados pelas células parafoliculares da glândula tiróide em mamíferos e pela glândula ultimobranquial de aves e peixes. A calcitonina é principalmente conhecida como um potente inibidor de reabsorção óssea osteoclástica, que implica ligação óssea de osteoclastos e degradação enzimática. Além disso, foi descoberto que há efeitos da Calcitonina de Salmão Intra nasal na Artrite Idiopática Juvenil em seres humanos (Siamopoulou A. et al, 2001, Calcif Tissue Int 69: 25-30) e na prevenção da erosão de osso e perda óssea na artrite reumatóide em seres humanos (Sileghem A., 1992, Annals of Rheumatic Diseases 51: 761-764). O processo degradativo associa a síntese de várias proteases e metaloproteínases, activação de proenzimas inactivas e inibição de enzimas activas (Leloup G, 1994, J Bone Miner Res, 9, 891-902). A Calcitonina é conhecida por induzir a retracção osteoclástica (Zheng MH, et al., 1992,

Exper Mole Pathol, 57:105-115) e interferir pelo menos com alguns dos passos do processo enzimático de reabsorção óssea (Einhorn TA et al., 1991, Olin Orthop 262: 286-297). Existem alguns estudos relatados acerca dos efeitos da calcitonina na cartilagem articular. In vitro, foi descoberto que a calcitonina estimula a síntese de proteoglicano e colagénio na cartilagem epifiseal animal (Baxter et al., 1984, Endocrinology 114:1196-1202) bem como em cartilagem de coelho e de seres humanos (Franchimont P, 1989, J Olin End Metab 69:259-266). O estudo da calcitonina no tratamento de osteoartrite experimental forneceu resultados conflituosos. Por exemplo, foi descoberto que a calcitonina previne a destruição da cartilagem em coelhos tratados com esteróides, meninsectomia parcial ou imobilização da articulação (Badurski JE et al., 1991, Lab Invest 49: 27-34), mas não foi observado nenhum efeito na cartilagem noutros modelos de meninsectomia (Colombo et al. 1983, Arthritis Rheum 26: 1132-1139). Além disso, a importância relativa das alterações de cartilagem e osso no início e progresso da osteoartrite ainda estão a ser debatidos. Nenhum estudo em seres humanos mostrou ainda ao nosso conhecimento a eficácia da calcitonina na osteoartrite.

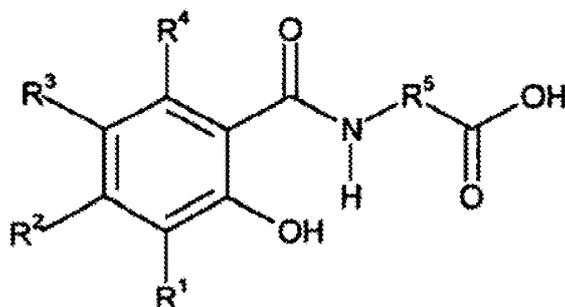
De acordo com a presente invenção, foi agora surpreendentemente descoberto que a calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão, (Asu 1-7)-enguia ou calcitonina humana são úteis na prevenção e tratamento da osteoartrite em mamíferos, particularmente em seres humanos.

Em particular, a libertação oral de calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão, (Asu 1-7)-enguia, como descrito na presente invenção, mostra um tal efeito. A mencionada libertação oral da calcitonina é geralmente o método de libertação de eleição dado que é conveniente, relativamente fácil e geralmente indolor, resultando em maior aceitação do paciente que outros modelos de libertação. De acordo com as descobertas particulares da presente invenção, é fornecido:

1. Uma composição farmacêutica que compreende calcitonina e um agente de libertação oral para uso no tratamento e/ou prevenção da osteoartrite num paciente humano com necessidade do mesmo, em que a calcitonina é libertada oralmente.

2. A composição para uso de acordo com a reivindicação 1, em que a mencionada calcitonina é calcitonina de salmão.

3. A composição para uso de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que o agente de libertação é seleccionado de entre o grupo que consiste em agentes de libertação de fórmula I.



Fórmula I

em que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  e  $R^4$  são independentemente hidrogénio, -OH,  $-NR^6R^7$ , halogéneo,  $C_1$ - $C_4$ alquilo, ou  $C_1$ - $C_4$ alcóxi;  $R^5$  é  $C_2$ - $C_{16}$ alquileno substituído ou não substituído,  $C_2$ - $C_{16}$ alquenileno substituído ou não substituído,  $C_2$ - $C_{16}$ alquil(arileno) substituído ou não substituído, ou arilo( $C_1$ - $C_{12}$ alquileno) substituído ou não substituído; e  $R^6$  e  $R^7$  são independentemente hidrogénio, oxigénio, ou  $C_1$ - $C_4$ alquilo; e os hidratos e solvatos dos mesmos.

4. A composição para uso na reivindicação 3, em que o agente de libertação é seleccionado de entre ácido N-(5-clorosaliciloil)-8-aminocaprílico(5-CNAC), ácido N-(10-[hidroxibenzoil]amino)decanóico (SNAD), ácido N-(8[2-hidroxibenzoil]amino)caprílico (SNAC) e os seus sais de monossódio e dissódio, solvatos de etanos dos seus sais de sódio e monohidratos dos seus sais de sódio e quaisquer combinações dos mesmos.

5. A composição para uso da reivindicação 4, em que o agente de entrega é o sal de dissódio de 5-CNAC.

6. A composição para uso de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a mencionada composição de calcitonina é conjugada com uma molécula de polímero.

7. A composição para uso de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a mencionada calcitonina é libertada numa composição farmacêutica que compreenda, pelo menos um agente de diminuição de pH farmacologicamente aceitável, pelo menos um melhorador de absorção e um revestimento entérico

8. Uma composição para uso de qualquer uma das reivindicações precedentes que compreenda ainda crospovidona.

9. Uma composição para uso com qualquer uma das reivindicações 3 a 5 compreendendo entre 0,4 a 2,5 mg de calcitonina.

10. Uma composição para uso com a reivindicação 9 compreendendo entre 0,8 a 1,2 mg de calcitonina.

11. Uma composição para uso com a reivindicação 9 ou a reivindicação 10 em que uma dose é administrada de manhã e uma dose é administrada à noite.

12. Uma composição farmacêutica compreendendo calcitonina e um agente de libertação para uso num método

de inibição de reabsorção e/ou normalização da renovação óssea num paciente humano com necessidade do mesmo, em que a calcitonina é administrada oralmente.

13. Uma composição farmacêutica compreendendo calcitonina e um agente de libertação para uso num método de preservação ou estimulação da cartilagem por via de um efeito directo ou indirecto nos condrócitos em pacientes humanos com necessidade do mesmo, em que a calcitonina é administrada oralmente.

14. O uso de calcitonina e um agente de libertação oral no fabrico de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção da osteoartrite, em que a calcitonina é libertada oralmente.

Além disso, na presente revelação ainda que não parte da invenção reivindicada estão:

1.1 Um método para prevenir e/ou tratar a osteoartrite num paciente com necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao mencionado paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável para libertação oral;

1.2 Um método para prevenir e/ou tratar a osteoartrite num paciente com necessidade do mesmo,

compreendendo a administração ao mencionado paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável para libertação oral, em que a quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina é libertada oralmente numa composição compreendendo a calcitonina e um agente de libertação para a calcitonina.

1.3 Um método para prevenir e/ou tratar a osteoartrite num paciente com necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao mencionado paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável para libertação oral, em que a quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina é libertada oralmente numa composição compreendendo a calcitonina, a qual é conjugada com uma molécula de polímero.

1.4 Um método de inibição da reabsorção e normalização da renovação óssea num paciente com necessidade do mesmo compreendendo a administração ao mencionado paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável para libertação oral;

1.5 Um método de preservar e estimular a cartilagem por via de um efeito directo ou indirecto nos condrócitos num paciente com necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao mencionado paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável para libertação oral;

1.6 Um método de inibição da fosfolipase A2 e/ou a actividade da colagenase num paciente com necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao mencionado paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável para libertação oral;

1.7 Um método de efeito estimulante na síntese de glicoseaminoglicanos e/ou proteoglicanos num paciente com necessidade do mesmo compreendendo a administração ao mencionado paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável para libertação oral;

1.8 Um método de actuação na não-homogeneidade na densidade ou rigidez do osso subcondral num paciente com necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao mencionado paciente de uma quantidade terapêuticamente

eficaz de calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável para libertação oral;

1.9 Um método de actuação sobre o processo inflamatório, conduzindo a atenuações da dor em movimento e sintomas relacionados (por exemplo, circunferência do joelho, ângulo de flexão do joelho, rigidez com inchaço) num paciente com necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao mencionado paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável para libertação oral;

2.0 Um método para reduzir a alteração degenerativa na articulação num paciente com necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao mencionado paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável para libertação oral;

2.1 Um método tal como definindo acima, compreendendo a coadministração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável para libertação oral, e

um segundo fármaco, sendo esta mencionada segunda substância uma inibidora de reabsorção óssea, uma formadora de osso ou redutora de dor na forma livre ou na forma de sal. Noutro aspecto, a revelação fornece um leque particular de dosagem de calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão a qual é eficaz e bem tolerada, i.e. segura para um paciente tomar. É preferido uma dose entre 0,4 a 2,5 mg de calcitonina de salmão para um paciente, por exemplo humano, por exemplo um ser humano com cerca de 70 kg. Mais preferida são as doses com cerca de 1 mg, por exemplo 0,8 e 1,2 mg. Também preferidas são as doses inferiores a 1 mg mas superiores a 0,4 mg. Ainda mais preferida é uma dose de cerca de 1 mg, por exemplo, 1 mg. A mais preferida é uma dose de cerca de 1 mg, por exemplo, entre 0,8 e 1,2 mg, administrada uma vez por dia, a um paciente com necessidade da mesma. As composições farmacêuticas compreendendo as mencionadas doses de acordo com a invenção podem ser as composições tal como fornecidas nos Exemplos, mas podem ser de preferência composições orais, por exemplo composições como definido no Exemplo 8. O regime de dosagem pode ser uma vez por dia ou duas vezes por dia, de preferência uma vez de manhã uma vez à noite.

Também de interesse na presente revelação são:

2.2 Um método para prevenir e/ou tratar a osteoartrite num paciente com necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao mencionado paciente de uma composição farmacêutica compreendendo entre 0,4 e 2,5 mg,

de preferência entre 0,8 e 1,2 mg, de preferência cerca de 1 mg, de uma calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão.

2.3 Uma composição farmacêutica compreendendo entre 0,4 e 2,5 mg, de preferência entre 0,8 e 1,2 mg, com maior preferência cerca de 1 mg, de uma calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão.

2.4 O uso de uma calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão, no fabrico de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção da osteoartrite, em que a mencionada calcitonina é fornecida numa composição farmacêutica que compreenda entre 0,4 e 2,5 mg, de preferência entre 0,8 e 1,2 mg, de maior preferência cerca de 1 mg, de uma calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão.

2.5 Uma composição farmacêutica para o uso no tratamento e/ou prevenção da osteoartrite compreendendo entre 0,4 e 2,5 mg, de preferência entre 0,8 e 1,2 mg, de maior preferência cerca de 1 mg, de uma calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão.

Fármacos secundários adequados podem incluir uma calcitonina de origem diferente, por exemplo de salmão, (Asu 1-7)-enguia ou calcitonina humana, um análogo da calcitonina ou um derivado do mesmo, uma hormona esteróide, por exemplo, um estrogénio, um agonista parcial de

estrogénio ou uma combinação estrogénio-progestativa, um SERM (Modulador Receptor de Estrogénio Selectivo) por exemplo raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, FC1271, Tibolone (Livial ®), vitamina D ou um seu análogo ou PTH, um fragmento de PTH ou um derivado de PTH por exemplo PTH (1-84), PTH (1-34), PTH (1-36), PTH (1-38), PTH (1-31)NH<sub>2</sub> ou PTS 893, bisfosfonatos (por exemplo aledroanato, risedronato, ácido zoledrónico, ibandronato); inibidores da protease, por exemplo inibidor da catepsina, de preferência um inibidor de catepsina K; libertadores de PTH; SARMS (moléculas receptoras de androgénio selectivo); inibidores de MMP (inibidores de metaloprotease), ranelato de strontium, inibidores de COX-2, por exemplo lumiracoxib (Prexige®), celecoxib (Celebrex®), rofecoxib (Vioxx®), valdecoxib (Bextra®), etoricoxib (Arcoxia®), ou uma mistura de inibidores de COX-1 e COX-2, por exemplo diclofenac.

Os termos "co-administração" ou "administração combinada" ou semelhantes como aqui utilizados pretendem incluir a administração dos agentes terapêuticos seleccionados a um único paciente, e pretendem incluir regimes de tratamento nos quais os agentes não são necessariamente administrados pela mesma via de administração ou ao mesmo tempo.

Também de interesse na presente revelação são:

3. A calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão (Asu 1-7)-enguia ou calcitonina humana na forma

livre ou na forma de sal, de preferência numa forma de libertação oral farmacêuticamente aceitável, para uso em qualquer método como definido em 1.1 a 2.2 acima, ou

4. A calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão (Asu 1-7)-enguia ou calcitonina humana na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma de libertação oral farmacêuticamente aceitável, para uso no fabrico de um medicamento em qualquer das indicações como definido em 1.1 a 2.2 acima; ou

5. Uma composição farmacêutica para uso em quaisquer indicações como definido em 1.1 a 2.2 acima compreendendo uma calcitonina por exemplo calcitonina de salmão (Asu 1-7)-enguia ou calcitonina humana na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma de libertação oral farmacêuticamente aceitável, em conjunto com um ou mais diluentes ou excipientes do mesmo farmacêuticamente aceitáveis.

6. Uma combinação farmacêutica compreendendo:

a) um primeiro agente que é uma calcitonina: por exemplo de salmão, (Asu 1-7)-enguia ou calcitonina humana na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável de libertação oral, e

b) um co-agente que é inibidor da reabsorção óssea, fármaco formador de osso ou agente de redução da dor, por exemplo como revelado acima.

7. Um conjunto de partes para uso na prevenção e/ou tratamento da osteoartrite, compreendendo o mencionado conjunto:

a) um primeiro agente que é uma calcitonina: por exemplo de salmão, (Asu 1-7)-enguia ou calcitonina humana na forma livre ou na forma de sal, de preferência numa forma farmacêuticamente aceitável de libertação oral, e

b) um co-agente que é inibidor da reabsorção óssea, fármaco formador de osso ou agente de redução da dor, por exemplo como revelado acima.

O termo "paciente" como usado aqui significa um paciente com necessidade de tratamento ou prevenção da osteoartrite ou de qualquer método como definido em 1.1 a 2.2 acima, em que o paciente significa mamíferos, tais como roedores, vacas, porcos, cães, gatos e primatas, em particular seres humanos.

O termo "combinação farmacêutica" como aqui usado significa um produto que resulta da mistura ou combinação de mais de um dos ingredientes activos e inclui tanto combinações fixas como não-fixas dos ingredientes activos.

O termo "combinação fixa" significa que os ingredientes activos, por exemplo calcitonina de salmão e um co-agente, são ambos administrados a um paciente em simultâneo na forma de uma única entidade de dosagem. O

termo "combinação não-fixa" significa que os ingredientes activos, por exemplo calcitonina de salmão e um co-aente, são ambos administrados a um paciente como entidades separadas, tanto em simultâneo, concorrentemente ou sequencialmente sem limites de tempo específicos, em que esta administração fornece níveis terapeuticamente eficazes dos dois compostos no corpo do paciente.

De preferência, a calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão na forma livre ou na forma farmacologicamente aceitável de sal, é co-administrada com um inibidor de protease, por exemplo um inibidor de catespina, por exemplo um inibidor de catespina K.

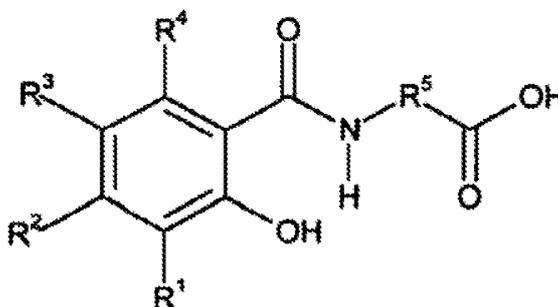
A utilidade da calcitonina, por exemplo calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, numa forma farmacologicamente aceitável de libertação oral para uso em qualquer método como definido acima, pode ser demonstrada em métodos de teste em animais bem como em clínica, por exemplo de acordo com o método daqui em diante descrito no exemplo B.

Quando o agente farmacologicamente activo é calcitonina de salmão, a dosagem apropriada será, é claro, variável em função, por exemplo, do hospedeiro e da natureza e gravidade do estado a ser tratado. No entanto, em geral, resultados satisfatórios serão obtidos sistemicamente com dosagens diárias de desde cerca de 0,5 Pg/kg até cerca de 10 Pg/kg de peso corporal animal, de

preferência 1 Pg/kg a cerca de 6 Pg/kg de peso corporal. Os excipientes inactivos farmacologicamente aceitáveis que são usados na formulação de calcitonina, por exemplo, na formulação oral de calcitonina, podem incluir polímeros e compostos inactivos os quais, por exemplo, ajudam na formulação ou fabrico da forma de dosagem oral sólida contemplada pela presente invenção ou os quais podem ajudar na libertação da composição oral sólida no ambiente gastrointestinal. Os ingredientes farmacologicamente inactivos, referidos acima, por exemplo incluem opcionalmente crospovidonas e povidonas, que podem ser qualquer crospovidona e povidona. A crospovidona é um homopolímero reticulado sintético de N-vinil-2-pirrolidona, também chamado 1-etnil-2-pirrolidinona, com um peso molecular de 1,000,000 ou mais. As crospovidonas comercialmente disponíveis incluem Polyplasdone XL, Polyplasdone XL-10, Polyplasdone INF-10 disponíveis em ISP, Kollidon CL, disponíveis em BASF Corporation. A crospovidona preferida é Polyplasdone XL. A povidona é um polímero sintético que consiste em grupos lineares de 1-vinil-2-pirrolidinona com um peso molecular geralmente entre 2,500 e 3,000,000. As povidonas comercialmente disponíveis incluem Kollidon K-30, Kollidon K-90F disponíveis em BASF Corporation e Plasdone K-30 e Plasdone K-29/32, disponíveis em ISP. Como mencionado acima, as crospovidonas e povidonas estão comercialmente disponíveis. Em alternativa, podem ser sintetizadas por processos conhecidos. A crospovidona, povidona ou combinação das mesmas está geralmente presente nas composições numa

quantidade de desde 0,5 a 50 por cento por peso relativo ao peso total da composição farmacêutica total, de preferência uma quantidade de desde 2 a 25 por cento, com maior preferência 5 a 20 por cento por peso relativo ao peso total da composição farmacêutica.

Os agentes de libertação úteis na formulação, por exemplo, a formulação oral, são quaisquer agentes úteis para a libertação do agente farmacologicamente activo em particular. Os agentes de libertação adequados são qualquer um dos amino ácidos modificados revelados na anteriormente mencionada Patente U.S. 5.866.536 ou qualquer um dos amino ácidos modificados descritos na anteriormente mencionada Patente U.S. 5.773.647 ou qualquer combinação dos mesmos. Adicionalmente, o agente de libertação pode ser o sal dissódico de qualquer um dos acima mencionados amino ácidos modificados bem como solvatos de etanol e hidratos dos mesmos. Os compostos adequados incluem compostos da seguinte fórmula I



em que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, e R<sup>4</sup> são independentemente hidrogénio, -OH, -NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, halogéneo, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>alkil, ou C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>alcóxy; R<sup>5</sup> é C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>alquilenos substituído ou não substituído, C<sub>2</sub>-

C<sub>16</sub>alqueenileno substituído ou não substituído, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>alquilo(arileno) substituído ou não substituído, ou aril(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>alquilenos) substituído ou não substituído; e R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> são independentemente hidrogénio, oxigénio, ou C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>alquilo; e hidratos e solvatos de álcool dos mesmos. Os compostos da fórmula I bem como os seus sais dissódicos e solvatos de álcool e hidratos dos mesmos estão descritos em WO 00/059863, bem como os métodos para os preparar.

O sal dissódico pode ser preparado a partir do solvato de álcool por evaporação ou secagem do solvato de etanol por métodos conhecidos na arte para formar o sal dissódico anidro. A secagem é geralmente levada a cabo a uma temperatura de desde cerca de 80 a 120°C, de preferência de cerca de 85 a cerca de 90°C, e de maior preferência de cerca de 85°C. O passo da secagem é geralmente realizado a uma pressão de 26" Hg ou superior. O sal dissódico anidro geralmente contém menos de cerca de 5% por peso de etanol e de preferência menos de cerca de 2% por peso de etanol, baseado em 100% do peso total do sal dissódico anidro. O sal dissódico do agente de libertação pode também ser preparado pela preparação de uma pasta do agente de libertação em água e adicionando dois equivalentes molares de hidróxido de sódio, alcóxido de sódio ou semelhante aquosos. Alcóxidos de sódio adequados incluem, mas não estão limitados a, metóxido de sódio, etóxido de sódio e combinações dos mesmos. Um método adicional de preparar o sal dissódico é pela reacção do agente de libertação com um molar equivalente de hidróxido

de sódio, para render o sal dissódico. O sal dissódico pode ser isolado como um sólido através da concentração da solução contendo o sal dissódico numa pasta espessa por destilação em vácuo.

Esta pasta pode ser seca num forno a vácuo para obter o sal dissódico do agente de libertação como um sólido. O sólido pode ainda ser isolado por secagem de spray numa solução aquosa do sal dissódico. Os agentes de libertação podem ser preparados por métodos conhecidos na arte, por exemplo como mencionado acima, pelos métodos descritos nas Patentes U.S. 5.773.647 e 5.866.536. Os solvatos de etanol, como descrito na mencionada WO 00/059863, incluem, mas não estão limitados, um complexo iónico de moléculas ou iões de solvente de etanol com moléculas ou iões do sal dissódico do agente de libertação. Tipicamente, o solvato de etanol contém cerca de uma molécula ou ião de etanol para cada molécula de sal dissódico do agente de libertação. O solvato de etanol do sal dissódico do agente de libertação pode ser preparado dissolvendo o agente de libertação em etanol. Tipicamente, cada grama do agente de libertação é dissolvida em de cerca de 1 a cerca de 50 mL de etanol e geralmente, de cerca de 2 a cerca de 10mL de etanol. O agente de libertação/solução de etanol é então feito reagir com um excesso molar de um sódio contendo sal, tal como um monossódio contendo sal, relativo ao agente de libertação, i.e. para cada mole de agente de libertação há mais de um catião de sódio, rendendo o solvato de etanol. O sal monossódico adequado

inclui, mas não está limitado a, hidróxido de sódio; alcóxidos de sódio, tais como metóxido de sódio e etóxido de sódio; e qualquer combinação dos anteriores. De preferência, pelo menos dois equivalentes molares do sal contendo monossódio são adicionados à solução de etanol, i.e. por cada mole de agente de libertação há pelo menos duas moles de catiões de sódio. Geralmente, a reacção é efectuada à temperatura ou abaixo da temperatura do refluxo da mistura, tal como à temperatura ambiente. O solvato de etanol é então recuperado por métodos conhecidos na arte, tais como a concentração da pasta em destilação atmosférica, arrefecimento da pasta concentrada e filtragem do sólido. O sólido recuperado por então ser seco a vácuo para obter o solvato de etanol. Os hidratos dos sais dissódicos dos agentes de libertação podem ser preparados pela secagem do solvato de etanol para formar um sal dissódico anidro, como acima descrito, e hidratando o sal dissódico anidro. De preferência, é formado o monohidrato do sal dissódico. Uma vez que o sal dissódico anidro é muito hidrocópico, o hidrato forma-se com a exposição à humidade atmosférica. Geralmente, o passo de hidratação é efectuado desde cerca da temperatura ambiente até cerca de 50°C, de preferência da temperatura ambiente até cerca de 30°C e num ambiente com pelo menos 50% de humidade relativa. Em alternativa, o sal dissódico anidro pode ser hidratado com vapor. Os agentes de libertação preferidos são ácido N-(5-clorosaliciloil)-8-aminocaprílico (5-CNAC), ácido N-(10-[hidroxibenzoil]amino)decanóico (SNAD), ácido N-(8[2-hidroxibenzoil]amino)caprílico (SNAC) e os seus sais

de monossódio e dissódio, solvatos de etanol dos seus sais de sódio e monohidratos dos seus sais de sódio e quaisquer combinações dos mesmos. O agente de libertação mais preferido é o sal dissódico de 5-CNAC e o seu monohidrato. De preferência, o sal dissódico está presente na quantidade de mais de 90% do peso por peso total do 5-CNAC presente na composição. Os agentes de libertação, 5 CNAC, SNAD e SNAC são muito hidrossolúveis e quase completamente, i.e., mais de 90%, absorvidos pelo tracto gastrointestinal quer seja ingeridos na forma micronizada ou grosseira. No entanto, foi descoberto, surpreendentemente, que quando uma forma micronizada de um dos agente excipientes é empregue na composição, a absorção do agente farmacologicamente activo da presente composição é mais completa na corrente sanguínea. Por tanto, o uso de um agente excipiente micronizado é um elemento requerido da presente invenção. Uma forma micronizada do agente excipiente, que é utilizada na preparação da forma de dosagem oral sólida da presente invenção, é definida como um agente excipiente que, quando adicionado à presente mistura de composição de ingredientes farmacologicamente activos e farmacologicamente inactivos, tem um tamanho de partícula médio de menos de 40 microgramas. Desejavelmente, o agente excipiente da presente invenção tem uma forma micronizada que é definida como um tamanho de partícula médio de menos de 20 microns. Mais desejavelmente, o agente excipiente da presente invenção tem uma forma micronizada que é definida como um tamanho de partícula médio de menos de 10 microns. As formas micronizadas do agente excipiente desta invenção

podem ser preparadas pela sua moagem num moinho que seja aceitável para moer ingredientes farmacêuticos e que seja capaz de moer os ingredientes farmacêuticos e/ou agente excipiente num tamanho de partícula fino e uniforme. Um exemplo de tal moinho é um Air Jet Mill Gem T<sup>®</sup> (Copley Scientific, Ltd., Nottingham, Reino Unido). O agente excipiente finamente moído quer separadamente ou o agente excipiente finamente moído e qualquer combinação de ingredientes adicionais finamente moídos da presente invenção podem ser peneirados, por exemplo, sobre uma peneira de malha com as aberturas apropriadas, de forma a permitir que apenas aqueles ingredientes que têm o tamanho de partícula requerido passem e sejam recolhidos para uso na presente invenção. As composições farmacêuticas da presente invenção tipicamente contêm uma quantidade de libertação efectiva de um ou mais agentes de libertação, i.e. uma quantidade suficiente para libertar o ingrediente activo para o efeito desejado. Geralmente, o agente de libertação está presente numa quantidade de 2,5% a 99,4% por peso, mais preferentemente 25% a 50% por peso.

De preferência uma calcitonina, por exemplo, calcitonina de salmão na forma livre ou na forma de sal, é libertada como uma composição farmacêutica compreendendo calcitonina e um agente de libertação para a calcitonina. Mais preferentemente, a dita composição farmacêutica compreende um agente de libertação seleccionado do grupo de 5-CNAC, SNAD e SNAC. Mais preferentemente, a dita composição farmacêutica compreende um agente de libertação

seleccionado do grupo de um sal dissódico de 5-CNAC, um sal dissódico de SNAD e um sal dissódico de SNAC. Ainda com maior preferência, a dita composição farmacêutica compreende um agente de libertação na forma micronizada.

Alternativamente, a calcitonina pode ser libertada oralmente com outras tecnologias, tais como a descrita em W0 94/26778; US 5.359.030; US 5.438.040; US 5.681.811; US 6.191.105; US 6.309.633; US 6.380.405; US 6.436.990; US 6.458.776; e US 6.479.692. Em resumo, tais formulações orais dizem geralmente respeito a composições de conjugação-estabilizada de (poli)peptídeo e proteína. Mais particularmente, tais formas de libertação oral dizem respeito a um aspecto geral da composição para conjugar de forma covalente complexos de calcitonina em que a calcitonina é ligada de forma covalente com uma ou mais moléculas de um polímero incorporando como uma parte integral do mesmo uma porção hidrofílica, por exemplo, um glicol polialquileno linear, e onde o mencionado polímero incorpora uma porção lipofílica como uma parte integral do mesmo. Num aspecto particular, tais formas de libertação oral dizem respeito a uma composição de calcitonina fisiologicamente activa compreendendo um peptídeo fisiologicamente activo ligado de forma covalente com um polímero compreendendo (i) uma porção de glicol polialquileno linear e (ii) uma porção lipofílica, em que o péptideo, a porção de glicol polialquileno linear e a porção lipofílica estão dispostos conformacionalmente em relação uns aos outros, de forma a que o peptídeo

fisiologicamente activo na composição de calcitonina fisiologicamente activa tem uma resistência in vivo intensificada à degradação enzimática, em relação à calcitonina fisiologicamente activa por si só (i.e., numa forma não conjugada vazia do polímero junto à mesma). Noutro aspecto, tais formas de libertação oral dizem respeito a uma composição de calcitonina fisiologicamente activa de conformação tridimensional, compreendendo uma calcitonina fisiologicamente activa junta de forma covalente com um complexo de polisorbato (i) uma porção de glicol polialquileno linear e (ii) uma porção lipofílica, em que a calcitonina fisiologicamente activa, a porção de glicol polialquileno linear e a porção lipofílica estão dispostos conformacionalmente em relação uns aos outros, de forma (a) a porção lipofílica está disponível exteriormente na conformação tridimensional e (b) a calcitonina fisiologicamente activa na composição de calcitonina fisiologicamente activa tem uma resistência in vivo intensificada à degradação enzimática, em relação à calcitonina fisiologicamente activa por si só. Num aspecto adicional, tais formas de libertação oral dizem respeito a um complexo de calcitonina conjugada de multiligando compreendendo uma porção da cadeia principal do triglicérido contendo: uma calcitonina bioactiva covalentemente ligada com uma porção da cadeia principal do triglicérido através de um grupo espaçador polialquileno glicol ligado a um átomo de carbono da porção da cadeia principal do triglicérido ou covalentemente ligado através de uma porção espaçadora de polialquileno glicol. Em tal

complexo de calcitonina conjugada de multiligando, os átomos de carbono d e B da porção bioactiva do triglicérido podem ter porções de ácido gordo ligadas por ligação covalente quer directamente a estas ou indirectamente por ligação covalente a estas através de porções espaçadoras de polialquileno glicol. Em alternativa, uma porção de ácido gordo pode ser ligada covalentemente quer directamente ou através de uma porção espaçadora de polialquileno glicol aos carbonos a e d da porção da cadeia principal do triglicérido, com a calcitonina bioactiva covalentemente ligada com o carbono-13 da porção da cadeia principal do triglicérido, quer sendo directamente de forma covalente ligada a estas ou indirectamente ligada a esta através de uma porção espaçadora de polialquileno. Num tal complexo de calcitonina conjugada de multiligando, a calcitonina bioactiva pode ser vantajosamente ligada à porção da cadeia principal do triglicérido modificada através de grupos espaçadores alquilo, ou alternativamente, outros grupos espaçadores aceitáveis, dentro do alcance geral da invenção. Como utilizado neste contexto, a aceitabilidade do grupo espaçador refere-se às características de aceitabilidade específicas de aplicação estérica, composicional e de uso final. Ainda num outro aspecto, tais formas de libertação oral dizem respeito a um complexo contendo uma porção de polisorbato incluindo a cadeia principal do triglicérido e grupos de funcionalização, incluindo: (i) um grupo de ácido gordo; e (ii) um grupo de polietileno glicol com uma porção fisiologicamente activa covalentemente ligada ao mesmo, por exemplo, porção

fisiologicamente activa covalentemente ligada a uma funcionalidade apropriada do grupo polietileno glicol.

Tal ligação covalente pode ser quer directamente, por exemplo, a uma funcionalidade terminal de hidróxi do grupo polietileno glicol, ou alternativamente, a ligação covalente pode ser indirecta, por exemplo, reactivamente revestindo o terminal hidróxi do grupo polietileno glicol com um grupo espaçador de funcionalidade terminal de carbóxi, de tal forma que o grupo polietileno glicol revestido resultante tem uma funcionalidade carbóxi à qual a porção fisiologicamente activa pode ser ligada covalentemente. Tais formas de libertação oral dizem respeito a um aspecto adicional a um complexo de calcitonina conjugado, hidrossolúvel, estável compreendendo uma calcitonina fisiologicamente activa covalentemente ligada a uma porção de glicolípido modificado de polietileno glicol fisiologicamente compatível. Em tal complexo, a calcitonina fisiologicamente activa pode ser covalentemente ligada à porção de glicolípido modificado de polietileno glicol fisiologicamente compatível por uma ligação covalente lábil a um grupo aminoácido de dez dos polipeptídeos. A porção de glicolípido modificado de polietileno glicol fisiologicamente compatível pode vantajosamente compreender um polímero de polissorbato, por exemplo, um polímero de polissorbato compreendendo grupos éster de ácido gordo seleccionados do grupo que consiste em monopalmitato, dipalmitato, monolaurato, dilaurato, trilaurato, monooleato, dioleato, trioleato, monoestearato,

diestearato e triestearato. Em tal complexo, a porção de glicolípido modificado de polietileno glicol fisiologicamente compatível pode adequadamente compreender um polímero seleccionado do grupo que consiste em éteres de polietileno glicol de ácidos gordos, e esterres de polietileno glicol de ácidos godos, em que os ácidos gordos, por exemplo, compreendem um ácido gordo seleccionado do grupo que consiste em ácido láurico, palmítico, oleico e esteárico. No complexo acima, a calcitonina fisiologicamente activa pode por ia de ilustração, conter uma calcitonina seleccionada do grupo que consiste em insulina, calcitonina, ACTH, glucagon, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiróide, eritropoetina, factores de libertação hipotálmica, prolactina, hormonas de estimulação da tiróide, endorfinas, encefalinas, vasopressina, opióides de ocorrência não natural, superóxido dismutase, interferão, asparaginase, arginase, arginina deaminase, adenosina ribonuclease deaminase, tripsina, quemotripsina e papaína.

Num outro aspecto, uma outra segunda forma de dosagem de libertação oral que pode ser utilizada de acordo com a invenção é uma tecnologia descrita em W0 97/33531; US 5.912.014 e US 608618. Resumidamente, tal forma de dosagem de libertação oral protege a calcitonina do ambiente acídico e das enzimas digestivas enquanto passa através do estômago e intestino, e facilita a sua entrada na corrente sanguínea. Uma vez que esteja na corrente sanguínea em segurança, a calcitonina pode exercer o seu efeito

terapêutico. Tal forma de libertação oral é, por exemplo, uma composição farmacêutica para libertação oral de calcitonina de salmão contendo: (A) uma quantidade terapeuticamente eficaz da mencionada calcitonina de salmão; (B) pelo menos um agente de redução de pH farmacêuticamente aceitável; (C) pelo menos um intensificador de absorção eficaz para promover a biodisponibilidade da mencionada calcitonina de salmão; e (D) um revestimento entérico; em que o mencionado agente de redução de pH está presente na composição farmacêutica numa quantidade que, se adicionada a 10 mililitros de 0,1 M de soluções aquosas de bicarbonato de sódio seria suficiente para reduzir o pH da mencionada solução a não mais de 5,5. A composição farmacêutica, na qual o mencionado revestimento entérico está presente num peso que não é mais de 20% do peso restante da mencionada composição farmacêutica, excluindo o mencionado revestimento entérico. A composição farmacêutica acima, em que o mencionado revestimento entérico está presente num peso que não é mais que 5-15% do peso do remanescente da mencionada composição farmacêutica excluindo o mencionado revestimento entérico.

As composições farmacêuticas com as quais a utilidade da calcitonina no tratamento da osteoartrite é mostrada, pode ser fornecida como uma cápsula incluindo uma cápsula de gel macia, comprimido, microcápsula, supositório ou outra forma sólida de dosagem oral, todas as quais podem ser preparadas por métodos conhecidos na arte.

As composições sólidas farmacêuticas da presente invenção podem se preparadas moendo primeiro quer o agente excipiente quer o agente excipiente com qualquer combinação dos ingredientes adicionais da presente composição num tamanho de partícula micronizado. O agente excipiente micronizado ou o agente excipiente com qualquer combinação dos ingredientes adicionais da presente invenção micronizados podem ser adicionalmente processados por métodos convencionais, por exemplo, misturando uma mistura do agente activo ou dos agentes activos, do agente de libertação, da crospovidona ou povidona e outros ingredientes, amassando, e enchendo em cápsulas ou, em vez de encher em cápsulas, moldando e seguindo com formação adicional de comprimidos ou moldagem por compressão em comprimidos. Adicionalmente, uma dispersão sólida pode ser formada por métodos conhecidos seguida de processamento adicional para formar um comprimido ou cápsula.

Os exemplos seguintes servem para ilustrar adicionalmente a invenção e devem ser entendidos prontamente por alguém versado na arte. Os exemplos não se destinam a limitar a presente invenção de qualquer forma.

### **Exemplos**

#### **A. Exemplos de Formulação**

##### **EXEMPLO 1: Formulação 1 (3 lotes)**

Preparação de 5-CNAC Micronizado: 5-CNAC grosso, o qual se destina a ser micronizado, é adicionado a um moinho a jacto (Air Jet Mill Gem T ® Copley Scientific, Ltd., Nottingham, UK) utilizando um moinho a jacto de bolo de cerâmica 80, com 8 cm de diâmetro, 6 ar N2, bocal com 0,5 mm com alimentação manual de cerca de 700 g/h. O 5-CNAC grosso é moído a jacto e periodicamente verificadas amostras ao microscópio, com medições de régua de referência para identificar quando o tamanho de partícula micronizada médio desejado é obtido. São moídos três lotes para criar lotes de 6 um, 35 um e 46 um. OS lotes micronizados separados são então peneirados individualmente utilizando um moinho de peneira cónico (Quadro Comil, Quadro Engineering Incorporated 613 Colby Drive, Waterloo, Ontario, Canada N2V 1A1) com uma peneira cónica U10, 813, misturador redondo, operando a 1500 upm com processamento de cerca de 150 kg/h.

Formulação I-3. Calcitonina de salmão Formulação com 5-CNAC de Tamanho de Partícula Diferente

Ingrediente	Quantidade (mg)	Percentagem (%)
Calcitonina de Salmão	1	0,25
5-CNAC micronizado	228	57
Avicel PH 102 ®	147	36,75
Crospovidona, NF	20	5
Estearato de Magnésio	4	1
Total	400	100

Preparação da Formulação 1: Três lotes diferentes de comprimidos são preparados utilizando os três diferentes lotes de dissódio de 5-CNAC micronizado, um lote de comprimidos com um tamanho de partícula médio de dissódio de 5-CNAC de 46 microns (Lote A), um segundo lote de comprimidos com um tamanho de partícula médio de dissódio de 5-CNAC de 6 microns (Lote B) e um terceiro lote de comprimidos com um tamanho de partícula médio de dissódio de 5-CNAC de 35 microns (Lote C).

0,50 g de calcitonina de salmão, pré-peneirada através de uma peneira com rede 40, 57 g de sal de dissódio de 5-CNAC micronizado, peneirado através de uma peneira com rede 35, e 10 g de Poliplasdon XL (crospovidona, NF, International Specialty Products, 1361 Alps Road, Wayne, New Jersey, 07470, EUA) é combinada num frasco de 500 ml e é misturada utilizando uma misturadora Turbula para 100 revoluções a uma velocidade de 46 RPM. 57 g de sal de dissódio de 5-CNAC adicionais, peneiradas através de uma peneira com rede 35 e 36,75 g de Avicel PH 102 ® são adicionadas ao frasco para 500 revoluções a uma velocidade de 46 RPM. 36,75 g adicionais de Avicel PH 102 ® são adicionadas ao frasco e é misturado por 100 revoluções adicionais a uma velocidade de 46 RPM. 4,0 g de estearato de magnésio são peneiradas para o frasco utilizado uma peneira com rede 35 e misturado por 1 minuto a uma velocidade de 46 RPM. A mistura final é comprimida em comprimidos utilizando uma prensa de comprimidos Manesty B3B. A peso de comprimido é de aproximadamente 400 mg.

A biodisponibilidade dos comprimidos criados no Exemplo 1 pode ser testada como se segue:

## **EXEMPLO 2**

### **Administração a primatas**

Os comprimidos são preparados como no Exemplo 1 utilizando três diferentes lotes de dissódio de 5-CNAC micronizado, um lote de comprimidos com um tamanho de partícula médio de dissódio de 5-CNAC de 46 microns (Lote A), um segundo lote de comprimidos com um tamanho de partícula médio de dissódio de 5-CNAC de 6 microns (Lote B) e um terceiro lote de comprimidos com um tamanho de partícula médio de dissódio de 5-CNAC de 35 microns (Lote C). Os comprimidos preparados a partir de cada um dos três diferentes lotes são administrados aos mesmos quatro macacos Rhesus separadamente em dias diferentes como se segue:

Os macacos Rhesus fiaram em jejum durante a noite anterior à dosagem e estão restritos em cadeiras e completamente conscientes, pela duração do período do estudo. Um comprimido do Lote A ou Lote B ou Lote C é administrado a cada macaco através de um tubo de gavagem, seguido de 10 mL de água.

São recolhidas amostras de sangue dos macacos Rhesus imediatamente antes da administração e às 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5 e 6 horas depois da administração. Um comprimido de cada um dos restantes dois lotes de comprimidos é doseado e são recolhidas amostras de sangue de forma semelhante mas em dias separados para cada um dos lotes de comprimidos restantes. A calcitonina de salmão de plasma resultante para cada dose e para cada maço é determinada por radioimunoensaio. Para cada macaco, a calcitonina de salmão de plasma de primata (SCT) para um lote e um período de tempo, concentrações médias de SCT para todos os macacos por um lote e um período de tempo, o Desvio Padrão (SD) das concentrações de SCT para um lote e um período de tempo e Erro Padrão da Média (SEM) para concentrações de SCT para todos os macacos por um lote e um período de tempo são calculados e relatados nas Tabelas 1, 2 e 3, como se segue.

TABELA 1 LOTE A: TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA DE 5-CNAC DE 46 MICROMETROS

Concentrações de Plasma de Calcitonina de Salmão ([pg/mL] (Comprimido Oral Único (200 mg 5-CNAC + 1 mg Sct) para o Macaco Rhesus)												
Animal n.º	Tempo [horas]											
	0	0,25	0,50	0,75	1	1,5	2	3	4	5	6	
1	0,0	17,8	91,7	279,7	449,2	278,8	48,0	10,5	5,3	3,3	62,9	
2	0,0	117,4	535,0	430,8	981,4	1718,0	2396,4	719,5	253,6	102,1	156,5	
3	0,0	113,9	754,5	1502,0	2351,0	2066,0	2684,4	1310,0	649,6	280,6	23,4	
4	0,0	46,0	127,0	425,5	765,8	1102,0	1599,0	1022,0	419,3	87,0	60,7	
Média	0,0	73,8	377,1	659,5	1136,9	1291,2	1682,0	765,5	332,0	118,3	68,9	
SD	0,0	49,7	322,2	566,0	838,4	783,8	1182,1	558,1	271,6	116,6	34,5	
SEM	0,0	24,9	161,1	283,0	419,2	391,9	591,0	279,0	135,8	58,3	62,9	
Limite mais baixo de qualificação (LLOQ) = 2,5 µg/mL, concentrações abaixo do LLOQ foram ajustadas para zero para a Tabela 1.												

TABELA 2 LOTE B: TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA DE 5-CNAC DE 6 MICROMETROS

Concentrações de Plasma de Calcitonina de Salmão ([pg/mL] (Comprimido Oral Único (200 mg 5-CNAC + 1 mg Sct) para o Macaco Rhesus)											
Animal n.º	Tempo [horas]										
	0	0,25	0,50	0,75	1	1,5	2	3	4	5	6
1	0,0	265,6	315,8	245,6	357,2	1927,0	3010,0	863,2	139,4	48,5	20,80
2	0,0	607,0	777,0	1336,0	1602,0	4146,0	7521,0	2681,0	420,8	73,9	43,2
3	0,0	80,9	225,5	325,6	655,6	1478,0	3979,0	2775,0	520,2	91,5	41,3
4	0,0	286,4	155,3	237,7	241,0	269,7	294,2	321,0	179,8	67,5	13,6
Média	0,0	310,0	368,4	536,2	714,0	1955,2	3701,1	1660,1	315,1	70,4	29,7
SD	0,0	218,5	280,2	534,7	617,2	1619,6	2986,3	1253,5	184,8	17,8	14,8
SEM	0,0	109,2	140,1	267,3	308,6	809,8	1493,1	626,7	92,4	8,9	7,4
Limite mais baixo de qualificação (LLOQ) = 2,5 µg/mL, concentrações abaixo do LLOQ foram ajustadas para zero para a Tabela 2.											

TABELA 3 LOTE B: TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA DE 5-CNAC DE 35 MICROMETROS

Concentrações de Plasma de Calcitonina de Salmão ([pg/mL] (Comprimido Oral Único (200 mg 5-CNAC + 1 mg Sct) para o Macaco Rhesus)											
Animal n.º	Tempo [horas]										
	0	0,25	0,50	0,75	1	1,5	2	3	4	5	6
1	0,0	36,1	94,7	428,0	739,4	2568,0	4025,0	1348,0	499,6	218,4	98,1
2	0,0	10,9	55,0	168,9	248,2	507,3	654,0	434,8	177,3	68,8	38,9
3	0,0	172,3	336,6	409,5	584,9	1487,0	2087,0	1479,0	162,0	52,0	17,2
4	0,0	7,9	46,9	208,1	390,1	1237,0	2347,0	1342,0	192,3	42,3	19,2
Média	0,0	56,8	133,3	303,6	490,7	1449,8	2278,3	1151,0	257,8	95,4	43,4
SD	0,0	78,0	137,1	134,1	215,8	853,5	1382,1	481,6	161,7	82,7	37,8
SEM	0,0	39,0	68,6	67,1	107,9	426,7	691,1	240,8	80,8	41,4	18,9

Limite mais baixo de qualificação (LLOQ) = 2,5 µg/mL, concentrações abaixo do LLOQ foram ajustadas para zero para a Tabela 3.

**EXEMPLO 3: Preparação das Formulações 2-4:**

Em alternativa, há formulações adicionais fornecidas:

Formulação 2:

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade (mg)</b>
sCT	0,25
5-CNAC (micronizado)	28,5
Avicel PH102	238,25
Crospovidona XL	15
Pluronic F68	3
Cab-O-Sil	3
Talco	6
Estearato Mg	6
Total	300

Formulação 3:

(

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade (mg)</b>
sCT	0,5
5-CNAC (micronizado)	28,5
Avicel PH102	238
Crospovidona XL	15
Pluronic F68	3
Cab-O-Sil	3
Talco	6
Estearato Mg	6
Total	300

Formulação 4:

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade (mg)</b>
sCT	0,5
5-CNAC (micronizado)	28,5
Avicel PH102	238
Crospovidona XL	15
Pluronic F68	3
Cab-O-Sil	3
Talco	6
Estearato Mg	6
Total	300

O processo para a preparação das formulações acima é semelhante ao daquela descrita no Exemplo 1. No entanto, uma vez que há alguns outros componentes para a fórmula corrente, há alguns desvios descritos abaixo:

1. Pré-pesar 0,3 g de sCT, passar sCT através de peneira com rede #60
2. Pesar 0,25 g de sCT DS peneirada
3. Misturar sCT e Crospovidona num recipiente adequado utilizando uma Misturadora Turbula, misturar durante 10 minutos
4. Passar através de peneira com rede #45
5. Adicionar 5-CNAC à mistura do passo #3, misturar durante 10 minutos
6. Passar através de peneira com rede #35
7. Adicionar Avicel na Mistura #5, misturar durante 10 minutos
8. Passar através de peneira com rede #35
9. Adicionar o restante Avicel, Pluronic F68 e Cab-O-Sil e misturar durante 20 minutos
10. Adicionar Talco e Estearato de Mg na mistura acima e misturar durante 2 minutos

Todos os equipamentos utilizados são os mesmos descritos no Exemplo 1.

#### **EXEMPLO 4: Preparação da Formulação 5:**

A formulação alternativa é apresentada resumidamente abaixo: 0,502 de calcitonina de salmão, pré-peneirada através de uma peneira de rede 40, 120 g de sal dissódio de 5-CNAC, pré-peneira através de uma peneira de rede 35 e 20 g de Poliplasdon XL (crospovidona, NF) é combinado num frasco de 500 mL e é misturado com uma

misturadora Turbula durante 2 minutos a uma velocidade de 46 RPM. 125,4 g adicionais de sal dissódio de 5-CNAC, pré-peneirado através de uma peneira com rede 35, e 32,5 g de Avicel PH 102 são adicionados ao frasco e é misturado durante um período de 8 minutos a uma velocidade de 46 RPM. 32,5 g adicionais de Avicel PH 102 ® são adicionadas ao frasco e é misturado durante 5 minutos a uma velocidade de 46 RPM. 4,0 g de estearato de magnésio são peneiradas para o frasco utilizando uma peneira de rede 35 e misturado por 1 minuto a uma velocidade de 46 RPM. A mistura final é comprimida em comprimidos utilizando uma prensa de comprimidos Manesty B3B. O peso de comprimido é de aproximadamente 400 mg.

**EXEMPLO 5: Preparação da Formulação 6: (não faz parte da invenção)**

Uma formulação alternativa compreendendo calcitonina de salmão adequada para administração nasal:

---

Quantidade de Ingrediente (por ml)	
1) Calcitonina de salmão (ingrediente activo)	0,1375 mg
excesso de 10%	0,01375 mg
	0,15125 mg
2) NaCl	7,5 mg
3) Cloreto de benzalónio	0,1 mg
4) HCl (1 N) adicionado a pH 3,3	
<hr/>	
5) Água destilada a um volume final de 1,0 ml.	

---

Os componentes 1 a 3 são combinados sob protecção de gás nitrogénio (numa escala para produzir um volume final de 2500 ml) de forma convencional, com 10% de calcitonina de salmão adicionada para permitir perda na filtração. 4) é depois adicionada para trazer o pH para 3,7 e água destilada é adicionada para um volume final de 2500 ml. A solução obtida é filtrada (por exemplo, utilizando um filtro 0,2 µm) para fornecer uma composição adequada para aplicação nasal e para enchimento de um dispensador nasal de pulverização com um volume de solução de 2 ml.

**EXEMPLO 6: Preparação das Formulações 7: (Não faz parte da invenção)**

Supositórios contendo 300 I.U. (Unidades Internacionais) de calcitonina de salmão são preparadas de acordo com, por exemplo, US 5149537 contendo a seguinte composição por supositório:

Ingrediente	Mg/Supositório
Calcitonina de Salmão (300 I.U)	0,0692.sup.+ ( 1 mg substância contém 4767 I.U. (média de 10% utilizado)
Ácido cítrico anidro	0,78
Dihidrato de citrato de trissódio	0,50
Manitol	48,615

Taurocolato de sódio	30,0
Base A de supositório	1420,0
Ingrediente	Mg/Supositório
	1500 mg

Como base de supositório A pode ser utilizada manteiga de cacau. É preferido utilizar bases de supositório sintéticas ou semi-sintéticas. Estes podem ser gorduras insolúveis em água, por exemplo glicéridos (mono-, di- e/ou tri-) de ácidos gordos, por exemplo, feitas de óleo de coco ou óleo de palma.

Glicéridos de ácido gordo de C.sub.10-18 de cadeia recta, convenientemente saturados são preferidos. São exemplos Witepsol (Marca Comercial Registada), por exemplo Witepsol série H, disponível em Dynamit Nobel, W. Alemanha; Suppocire (Marca Comercial Registada), por exemplo Suppocire AM ou AS2, disponível em Gattefosse, França e Novata (Marca Comercial Registada), por exemplo Novata BD, disponível em Henkel GmbH, W. Alemanha.

Alternativamente, podem ser usados álcoois Guerbet e as bases de supositório hidrossolúveis como polietileno glicol.

De preferência, a base de supositório tem uma baixa faixa de fundição, por exemplo, 30 a 36°C.

### Procedimento de preparação

a) Preparação do granulado (para 3.500 doses)

0,2423 g de calcitonina, 2,73 g do ácido cítrico, 1,75 g do sal de trissódio são misturados no estado seco e dissolvidos em 14,0 g de água. 170,3 g de manitol peneirado é adicionada (AS 700 microns, WD 120 microns). A massa é amassada e peneirada (AS 1,600 microns, WD 450 microns). O pó desaglomerado é seco a 40°C durante 25 minutos, e peneirados (AS 450 microns, AS 120 microns).

b) Adição de intensificador e moldagem (para 3.000 doses)

150 g de pó obtido do passo a) e 90 g de taurocolato de sódio moído são misturados, peneirados (AS 250; WD 100 microns), e misturados novamente. A mistura é adicionada a 4260 g de base de supositório A a 38°C. A homogeneização é efectuada (aparelho Polyton, velocidade ajustada em 4) durante 3 minutos. A massa é transferida a 33°C para um recipiente pré-aquecido numa máquina de fabrico de supositórios (BONAPACE).

Os supositórios são moldados a uma temperatura desde 33 a 35 °C em folha (ou folha de alumínio) de polivinilcloroto neutro em doses de cerca de 1,5 ml e peso 1,5 g. O arrefecimento é efectuada com uma corrente de ar a 20°C. Rende 2.590 supositórios. Tempo de desintegração 6

minutos. Ponto de fundição 34,9°C. Dureza 81N a 20°C, pH na água 4,2.

B. Exemplo demonstrando a eficácia da calcitonina na osteoartrite:

#### **Exemplo 7: Ensaio Clínico**

36 pacientes com osteoartrite completando o ensaio são incluídos num estudo duplamente cego de 12 semanas (84 dias), controlado com placebo, monocentro, paralelo. O objectivo é determinar *in vivo* os efeitos de uma formulação oral de calcitonina em marcadores bioquímicos de osso, cartilagem e metabolismo sinovial na osteoartrite humana. Os pacientes são divididos em três grupos: dois grupos tratados com calcitonina oral 0,5 mg ou 1 mg uma vez por dia e um grupo de controlo que recebe um placebo.

Os critérios de inclusão são (Tabela 4):

- Mulheres ou com mais de 55 anos de idade ou com mais de 50 anos de idade e pelo menos 5 anos em menopausa (natural ou cirúrgica).
- Homens com mais de 50 anos de idade. Aqueles que tendo relacionamento com uma mulher que não esteja em pós-menopausa terão de usar um contraceptivo de barreira durante a duração do estudo e continuar nas 4 semanas seguintes após a conclusão do estudo.

- Pacientes com osteoartrite activa na anca e/ou no joelho. A hiperactividade da articulação doente documentada em cintiligramas de osso recente (= 6 meses antes do estudo) é obrigatória.
- Pacientes com pelo menos dor moderada no movimento activo (superior ou igual a 10 na escala de LEQUESNE (ver MG Lequesne, 1997, J of Rheumatology 24: 779-781)
- Pacientes que leram a folha de informação e assinaram o formulário de consentimento.

Os critérios de exclusão são (Tabela 5):

---

- Pacientes com osteoartrite aguda e requerendo intervenção de artroplastia durante a duração do estudo ou requerendo imobilização da articulação durante várias semanas antes ou durante o período do estudo.
- Os pacientes que sofrem de doenças de depósito de cristal ou com defeitos hereditários ou congénitos conhecidos.
- Pacientes que sofrem de doenças clínicas significativas hepática, renal, cardiovascular, psiquiátrica, endócrina e/ou hematológica.
- Pacientes que sofrem de qualquer outra doença sistémica ou local julgada ser incompatível com o presente protocolo pelo Investigador.
- Pacientes com valores de laboratório anormais julgados como clinicamente significativos.
- Pacientes que receberam qualquer injeção intra-articular ou administração sistémica de corticoesteróides durante as 8 semanas antes do início do estudo.

- Pacientes com uma história conhecida de abuso de álcool e/ou drogas ou aqueles improváveis de cooperar com o Investigador de acordo com o protocolo do estudo.

---

**Os pontos chave do estudo (Tabela 6):**

---

- Os pontos chave primários do estudo são os níveis circulantes dos marcadores humanos do metabolismo de cartilagem, sinóvia e osso.
  - Os pontos chave secundários do estudo são a eficácia e tolerabilidade do tratamento de fármaco, como avaliado pelo paciente e pelo Investigador.
  - Adicionalmente, avaliações de segurança consistem na monitorização e registo de todos os eventos adversos e eventos adversos graves, a monitorização regular dos valores de hematologia, química sanguínea e urina, medição regular dos sinais vitais e o desempenho nos exames físicos.
- 
- 

**O procedimento do estudo:** Seguindo-se a um período de lavagem de pré-tratamento de 2 semanas, durante o qual apenas é autorizada a ingestão de paracetamol com a dose máxima diária de 3.000 mg, cada paciente é aleatoriamente atribuído à ingestão ou do placebo ou de uma das duas dosagens da formulação oral de calcitonina. Durante as 12 semanas do período de tratamento, o paciente

está autorizado a tomar paracetamol em caso de necessidade numa dose diária máxima de 3.000 mg.

**Os pontos de tempo de avaliação dos pacientes são (Tabela 7):**

---

- Visita 1: dia -14: visita de triagem. Começo do período de lavagem.
  - Visita 2: dia 0: Visita de linha base. Começo do tratamento.
  - Visita 3: dia 14: 2 semanas de tratamento completas.
  - Visita 4: dia 42: 6 semanas de tratamento completas.
  - Visita 5: dia 84: Visita final. 12 semanas de tratamento completas.
- 

**O tipo de avaliações (Tabela 8):**

---

• Nas visitas 2, 3, 4 e 5, foram recolhidas amostras da segunda urina em jejum da manhã bem como plasma, sêrum e fluído sinovial (se existente) e foram analisadas para marcadores de metabolismo de cartilagem, sinóvia e osso através de imunoensaios específicos.

- Os eventos adversos são registados nas visitas 3, 4 e 5.
- Uma ou mais articulações (joelho ou anca) são avaliadas pelo questionário LEQUESNE na visita 1 (visita de triagem), e documentados como elegíveis para a selecção na visita seguinte, na base de intensidade da dor sob movimento activo.

Na visita 2 (visita de linha de base) estas articulações elegíveis são reavaliadas e a articulação mais dolorosa para a qual a intensidade da dor for igual ou superior a 10 no questionário de LEQUESNE, é seleccionada como articulação alvo.

- A eficácia do fármaco na articulação alvo é feita com base na avaliação da intensidade da dor entre visitas. 2 e 5 (em relação à intensidade da dor na visita 1) por um exame clínico e pelo questionário LEQUESNE.
- No que respeita à avaliação da eficácia do tratamento, a quantidade de medicação de emergência (paracetamol) tomada pelo paciente durante o período de 12 semanas de tratamento é considerada.
- A eficácia do fármaco e a tolerabilidade são adicionalmente avaliadas e o paciente nas visitas 3, 4 e 5 através de duas escalas VAS separadas (ver Huskinson E.C., 1974, The Lancet: 1127-1131)

**Exemplo 8: tratamento de 3 meses com calcitonina de salmão oral suprime produtos de degradação de colagénio urinário do tipo II em mulheres em pós-menopausa**

**Indivíduos e Métodos:** A população de estudo consiste em 152 mulheres dinamarquesas geralmente saudáveis em pós-menopausa com 55-85 anos de idade, que estejam em pós-menopausa há pelo menos 5 anos. As mulheres receberam tratamento com sCT oralmente doseado diariamente (0.15, 0.4, 1.0, ou 2.5 mg) (ver abaixo as composições farmacêuticas) combinado com molécula excipiente com base em tecnologia de eligen (200 mg) ou placebo, durante 3 meses. Todas as participantes receberam um suplemento de cálcio de 1000 mg e 400 IU de vitamina D diariamente ao longo do estudo. Os parâmetros de eficácia são o telopeptídeo C-terminal urinário de 24 horas de colagénio

do tipo I (CTX-I) e CTX-II corrigido para excreção de creatinina avaliada na linha de base e após a terapia de 3 meses.

**As composições farmacêuticas compreendendo calcitonina de salmão utilizadas no estudo**

Ingrediente	Quantidade por comprimido (mg)			
Calcitonina de Salmão	0,15	0,4	1	2,5
Sal de dissódio de 5-CNAC (não micronizado)	228	228	228	228
Celulose microcristalina, NF	147	147,6	147	147,5
(Avicel PH-102)	85			
Crospovidona, NF	20	20	20	20
Estearato de Magnésio NF, EP	4	4	4	4
Total	400	400	400	400

**Processo de fabrico:**

- i) Pesar 5-CNAC e dividir em 2 partes iguais e etiquetar como A e B.
- ii) Pesar Avicel e dividir em 2 partes iguais e etiquetar como A e B.

- 1) Colocar a crospovidona numa peneira com rede 35. Colocar a calcitonina pré-pesada em cima da crospovidona, e depois adicionar a parte A de 5-CNAC.
- 2) Peneirar a crospovidona/calcitonina/5-CNAC e transferir para uma misturadora de tamanho adequado e misturar durante 500 revoluções.
- 3) Peneirar a parte B de 5-CNAC através de uma peneira com rede 35.
- 4) Adicionar a parte B de 5-CNAC peneirado e a parte A de Avicel à mistura do passo 2 e misturar durante 800 revoluções.
- 5) Adicionar a parte B de Avicel à mistura acima do passo 4 e misturar durante 500 revoluções.
- 6) Peneirar o estearato de magnésio através de uma peneira de rede 35 e adicionar à mistura do passo 5 e misturar durante 100 revoluções.

**Resultados:** Não há diferenças significativas nos diferentes grupos de intervenção de sCT em termos de idade, BMI, concentração urinária de linha de base de CTX-I e CTX-II. Há uma clara e significativa relação dependente da dose no CTX-II urinário de 24 horas a sCT oral (ANOVA=0,012). Em comparação com o placebo, o grupo de 1,0 mg diário revela o maior decréscimo em CTX-II urinário após o tratamento de 3 meses (-19,7%, p=0,009). As mulheres que receberam 0,4 mg e 2,5 mg de sCT também têm decréscimos significativos no CTX-II urinário (-15,2%, p=0,04, e -17,5%, p=0,02, respectivamente). As respostas dependentes de dose semelhante encontram-se no CTX-I urinário de 24 horas no

tratamento de 3 meses. As mulheres que receberam 1,0 mg de sCT também têm a maior redução no CTX-I urinário de 24 horas (-41,0%,  $p < 0,001$ ) em comparação com as mulheres no grupo placebo. Na estratificação da população do estudo em tertiles de CTX-II urinário de linha de base, o significado de CTX-II nos diferentes tertiles foi de 114,6, 197,9 e 385,4 mg/mmol, respectivamente. As mulheres no tertile mais alto de CTX-II urinário na linha de base mostram as maiores respostas a sCT oral de uma forma dependente da dose. As mulheres que receberam 1,0 mg de sCT, e estão na renovação superior de cartilagem na linha de base, têm os maiores decréscimos no CTX-II urinário após o tratamento de 3 meses em comparação com as mulheres no tertile mais baixo (-36,6% vs. -9,9%,  $p = 0,005$ ). Uma tendência semelhante é observada com 0,4 mg de sCT quando comparado com mulheres no tertile mais alto de CTX-II urinário com as do tertile mais baixo.

C- telopeptídeo de colagénio do tipo I (CTX I) é considerado um marcador especialmente sensível à reabsorção de osso; inversamente, C- telopeptídeo de colagénio do tipo II (CTX II) é considerado um marcador de cartilagem útil.

Conclusão: O nosso estudo sugere fortemente que a CT de salmão reduz a degradação da cartilagem e portanto, pode fornecer benefícios terapêuticos para a osteoartrite numa faixa de dose de 0,4 a 2,5 mg de calcitonina de

salmão, com maior preferência cerca de 1 mg de calcitonina de salmão.

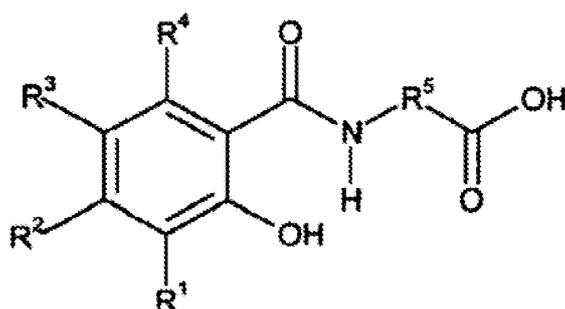
Lisboa, 6 de Dezembro de 2012

**REIVINDICAÇÕES**

1. Uma composição farmacêutica que compreende calcitonina e um agente de libertação oral para uso no tratamento e/ou prevenção da osteoartrite num paciente humano com necessidade do mesmo, em que a calcitonina é libertada oralmente.

2. A composição para uso de acordo com a reivindicação 1, em que a mencionada calcitonina é calcitonina de salmão.

3. A composição para uso de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que o agente de libertação é seleccionado de entre o grupo que consiste em agentes de libertação de fórmula I.



Fórmula I

em que

R1, R2, R3, e R4 são independentemente hidrogénio, -OH, -NR6R7, halogéneo, C1-C4alkil, ou C1-C4alcóxy; R5 é C2-C16alquileno substituído ou não substituído, C2-

C16alqueenileno substituído ou não substituído, C1-C12alquilo(arileno) substituído ou não substituído, ou aril(C1-C12alquileno) substituído ou não substituído; e R6 e R7 são independentemente hidrogénio, oxigénio, ou C1-C4 alquilo; e hidratos e solvatos de álcool dos mesmos.

4. A composição para uso na reivindicação 3, em que o agente de libertação é seleccionado de entre ácido N-(5-clorosaliciloil)-8-aminocaprílico(5-CNAC), ácido N-(10-[hidroxibenzoil]amino)decanóico (SNAD), ácido N-(8[2-hidroxibenzoil]amino caprílico (SNAC) e os seus sais de monossódio e dissódio, solvatos de etanos dos seus sais de sódio e monohidratos dos seus sais de sódio e quaisquer combinações dos mesmos.

5. A composição para uso da reivindicação 4, em que o agente de entrega é o sal de dissódio de 5-CNAC.

6. A composição para uso de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a mencionada composição de calcitonina é conjugada com uma molécula de polímero.

7. A composição para uso de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a mencionada calcitonina é libertada numa composição farmacêutica oral que compreenda, pelo menos um agente de diminuição de PH farmacêuticamente aceitável, pelo menos um melhorador de absorção e um revestimento entérico.

8. Uma composição para uso de qualquer uma das reivindicações precedentes que compreenda ainda crosprovidona.

9. Uma composição para uso com qualquer uma das reivindicações 3 a 5 compreendendo entre 0,4 a 2,5 mg de calcitonina.

10. Uma composição para uso com a reivindicação 9 compreendendo entre 0,8 a 1,2 mg de calcitonina.

11. Uma composição para uso com a reivindicação 9 ou a reivindicação 10 em que uma dose é administrada de manhã e uma dose é administrada à noite.

12. Uma composição farmacêutica compreendendo calcitonina e um agente de libertação para uso num método de inibição de reabsorção e/ou normalização da renovação óssea num paciente humano com necessidade do mesmo, em que a calcitonina é administrada oralmente.

13. Uma composição farmacêutica compreendendo calcitonina e um agente de libertação para uso num método de preservação ou estimulação da cartilagem por via de um efeito directo ou indirecto nos condrócitos num paciente humano com necessidade do mesmo, em que a calcitonina é administrada oralmente.

14. O uso da calcitonina e um agente de libertação oral no fabrico de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção da osteoartrite num paciente humano com necessidade do mesmo, em que a calcitonina é libertada oralmente.

Lisboa, 6 de Dezembro de 2012

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.*

**Documentos de patentes citadas na descrição**

- US 5866536 A
- US 5773647 A
- WO 00059863 A
- WO 9426778 A
- US 5359030 A
- US 5438040 A
- US 5681811 A
- US 6191105 B
- US 6309633 B
- US 6380405 B
- US 6436990 B
- US 6458776 B
- US 6479692 B
- WO 9733531 A
- US 5912014 A
- US 608618 A
- US 5149537 A

**Literatura que não é de patentes citada na descrição**

- **SIAMOPOULOU A. et al.** *Calcif Tissue Int*, 2001, vol. 69, 25-30
- **SILEGHEM A.** *Annals of Rheumatic Diseases*. 1992, vol. 51, 761-764
- **LELOUP G.** *J Bone Miner Res*, 1994, vol. 9, 891-902
- **ZHENG MH et al.** *Exper Mole Pathol*, 1992, vol. 57, 105-115
- **EINHORN TA et al.** *Clin Orthop*, 1991, vol. 262, 286-297
- **BAXTER et al.** *Endocrinology*, 1984, vol. 114, 1196-1202
- **FRANCHIMONT P.** *J Clin End Metab*, 1989, vol. 69, 259-266
- **BADURSKI JE et al.** *Lab Invest*, 1991, vol. 49, 27-34
- **COLOMBO et al.** *Arthritis Rheum*, 1983, vol. 26, 1132-1139