



(11) **Número de Publicação:** PT 831787 E

(51) **Classificação Internacional:** (Ed. 6 )  
A61K009/16 A A61K038/27 B

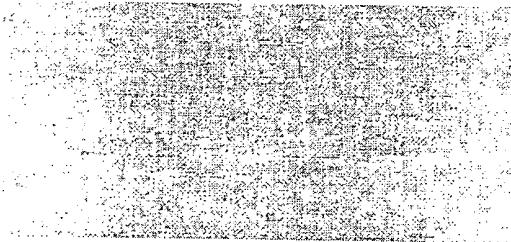
(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) <b>Data de depósito:</b> 1996.06.03	(73) <b>Titular(es):</b> ALKERMES CONTROLLED THERAPEUTICS, INC. 4TH FLOOR, 64 SIDNEY STREET CAMBRIDGE, MA 02139 US
(30) <b>Prioridade:</b> 1995.06.07 US 473544 1995.06.07 US 477725	
(43) <b>Data de publicação do pedido:</b> 1998.04.01	(72) <b>Inventor(es):</b>
(45) <b>Data e BPI da concessão:</b> 2001.08.22	OLUFUNMI LILY JOHNSON US MEDHA M. GANMUHKI US HOWARD BERNSTEIN US HENRY AUER US AMIN M. KHAN US
	(74) <b>Mandatário(s):</b> MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO 50, 5º AND. 1269-163 LISBOA PT

(54) **Epígrafe:** COMPOSIÇÃO PARA LIBERTAÇÃO SUSTENTADA DA HORMONA DE CRESCIMENTO HUMANO

(57) **Resumo:**

COMPOSIÇÃO PARA LIBERTAÇÃO SUSTENTADA DA HORMONA DE CRESCIMENTO HUMANO



Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA  
 Telefs.: 21 888 51 51 / 2 / 3  
 Linha azul: 808 200 689  
 Fax: 21 887 53 08 - 886 00 66  
 E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

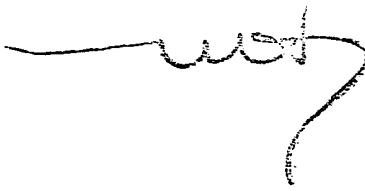


INSTITUTO NACIONAL  
 DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
 MINISTÉRIO DA ECONOMIA

### FOLHA DO RESUMO

PAT. INV.	MOD. UTI.	MOD. IND.	DES. IND.	TOP. SEMIC.	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)						
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							
N.º Objectos <input type="text"/> N.º Desenhos <input type="text"/>											
N.º 831787 (11) DATA DO PEDIDO ____ / ____ / ____ (22)											
<b>REQUERENTE</b> (71) (NOME E MORADA) ALKERMES CONTROLLED THERAPEUTICS, INC., americana, industrial e comercial, com sede em 4th floor, 64 Sidney Street, Cambridge, MA 02139, Estados Unidos da América											
CÓDIGO POSTAL <input type="text"/>											
<b>INVENTOR(ES) / AUTOR(ES)</b> (72) OLUFUNMI LILY JOHNSON, MEDHA M. GANMUKHI, HOWARD BERNSTEIN, HENRY AUER, M. AMIN KHAN											
<b>REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S)</b> (30)											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">DATA DO PEDIDO</th> <th style="width: 33%;">PAÍS DE ORIGEM</th> <th style="width: 33%;">N.º DO PEDIDO</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>07-06-95 07-06-95</td> <td>E.U.A. E.U.A.</td> <td>473544 477725</td> </tr> </tbody> </table>						DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO	07-06-95 07-06-95	E.U.A. E.U.A.	473544 477725
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO									
07-06-95 07-06-95	E.U.A. E.U.A.	473544 477725									
<b>FIGURA</b> (para interpretação do resumo)											
<b>EPIGRAFE</b> (54) "COMPOSIÇÃO PARA LIBERTAÇÃO SUSTENTADA DA HORMONA DE CRESCIMENTO HUMANO"											
<b>RESUMO</b> (max. 150 palavras) (57)											

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS



## **D E S C R I Ç Ã O**

### **COMPOSIÇÃO PARA LIBERTAÇÃO SUSTENTADA DA HORMONA DE CRESCIMENTO HUMANO**

#### Contexto da Invenção

A hormona de crescimento humano (hGH) é uma proteína segregada pela glândula pituitária e que pode ser produzida por engenharia genética recombinante. A hGH provocará crescimento em todos os tecidos do corpo com capacidade para crescer.

A hGH é tipicamente utilizada para tratar pacientes que sofrem de nanismo hipopituitário. Correntemente, a hGH aquosa é administrada aos pacientes na forma de um *bolus* subcutâneo, três vezes por semana ou uma vez diariamente, para manter níveis adequados de hGH no soro. Para os pacientes a quem a hGH é administrada cronicamente, as injecções frequentes provocam problemas de tolerância.

Para resolver os problemas associados a injecções repetitivas de hGH aquosa, fizeram-se tentativas para formular dispositivos de libertação controlada contendo doses de hGH mais elevadas do que uma injecção de *bolus*, encerrados em cápsulas numa matriz polimérica, onde a hGH seria libertada *in vivo* durante um período de cerca de uma semana ou mais.

No entanto, estes dispositivos de libertação controlada exibiram, frequentemente, jorros iniciais elevados de hGH libertada, a que se seguiu libertação mínima de hGH. Além disso, por causa da concentração elevada de hGH nestes dispositivos de libertação controlada, as moléculas de hGH mostraram tendência para se agregarem após vários dias, formando hGH agregada que é imunogénica *in vivo* e provavelmente tem actividade biológica reduzida.

Assim, mostra-se necessário um meio para sustentar a libertação *in vivo* de hGH biologicamente activa sem provocar uma resposta do sistema imunitário durante o período de libertação de hGH.

#### Resumo da Invenção

Esta invenção refere-se a uma composição, e a métodos para produzir e utilizar a referida composição, para a libertação sustentada de hormona de crescimento humano (hGH) biologicamente activa e estabilizada. A composição de libertação sustentada desta invenção inclui uma matriz polimérica de um polímero biocompatível e partículas de hGH biologicamente activa e estabilizada por catião metálico, sendo que as referidas partículas estão dispersas no polímero biocompatível.

O método da invenção para produzir uma composição para a libertação sustentada de hGH inclui dissolver um polímero biocompatível num solvente de polímero para formar uma solução de polímero, dispersar partículas de hGH biologicamente activa e estabilizada na solução de polímero e por fim solidificar o polímero para produzir uma matriz polimérica contendo uma dispersão das referidas partículas de hGH.

O método para utilizar a composição de libertação sustentada da presente invenção inclui assegurar, num sujeito, um nível sanguíneo terapeuticamente eficaz de hormona de crescimento humano biologicamente activa e não-agregada, durante um período sustentado, administrando ao sujeito uma dose da referida composição de libertação sustentada.

As vantagens desta formulação de libertação sustentada de hGH incluem níveis sanguíneos *in vivo* de hGH mais longos e mais consistentes, jorros iniciais de hGH mais baixos e aumento dos benefícios terapêuticos por eliminação de flutuações nos níveis de hGH no soro. As vantagens também incluem uma maior tolerância e aceitação do paciente por redução do número de injecções necessárias. As vantagens incluem ainda a capacidade de utilizar quantidades menores de hGH, comparadas com o regime de injecção de *bolus*, uma vez que os níveis de hGH no soro são mantidos mais perto dos limiares terapêuticos.

### Descrição Pormenorizada da Invenção

A hormona de crescimento humano (hGH) utilizada nesta invenção é hGH biologicamente activa na sua forma molecular (monomérica ou não-agregada). A hGH molecular é tipicamente não-imunogénica.

A hGH agregada pode induzir uma resposta imunitária, cujo resultado é a formação de anticorpos contra a hGH. Este efeito pode comprometer a eficácia da terapia a longo-prazo com hGH. Adicionalmente, a hGH agregada pode estimular uma resposta auto-imunitária à hGH endógena.

Uma libertação sustentada da hormona de crescimento humano biologicamente activa e não-agregada é uma libertação que resulta em níveis mensuráveis no soro de hGH monomérica e biologicamente activa durante um período superior ao obtido por administração directa de hGH aquosa. É preferido que uma libertação sustentada seja uma libertação de hGH durante um período de cerca de uma semana ou mais; mais preferivelmente durante um período de cerca de duas semanas ou mais.

Uma libertação sustentada de hGH biologicamente activa e não-agregada a partir de uma matriz polimérica pode ser uma libertação contínua ou descontínua, com taxas de libertação relativamente constantes ou variáveis. A continuidade da libertação da hGH e o nível de hGH libertado podem ser estabelecidos utilizando, *inter alia*, um ou mais tipos de composições de polímeros, cargas de hGH e/ou selecção de excipientes para produzir o efeito desejado.

(hGH) estabilizada inclui hGH biologicamente activa e não-agregada que é complexada com pelo menos um tipo de catião metálico multivalente, com uma valência de +2 ou superior, proveniente de um componente de catião metálico. A hGH estabilizada na composição de libertação sustentada da presente invenção está na forma de partículas.

Catiões metálicos multivalentes adequados incluem catiões metálicos contidos em componentes de catiões metálicos biocompatíveis. Um componente de catião metálico é

biocompatível se o componente de catião for não-tóxico para o sujeito receptor, nas quantidades utilizadas, e também se não apresentar efeitos perniciosos ou inconvenientes significativos no corpo do sujeito receptor, como uma reacção imunológica no local da injecção.

Tipicamente, a razão molar entre componente de catião metálico e hGH, para o catião metálico que estabiliza a hGH, situa-se entre cerca de 4:1 e cerca de 10:1.

Um catião metálico preferido utilizado para estabilizar a hGH é  $Zn^{+2}$ . Numa especificação mais preferida, a razão molar de componente de catião metálico, contendo catiões  $Zn^{+2}$ , para hGH é cerca de 6:1.

A aptidão de um catião metálico para estabilizar a hGH pode ser determinada por alguém experimentado na técnica, realizando uma variedade de procedimentos indicadores de estabilidade como electroforese em gel de poliacrilamida, focagem isoeléctrica, cromatografia de fase reversa, HPLC e testes de potência em partículas liofilizadas de hGH contendo catiões metálicos, para determinar a potência da hGH após liofilização e durante o período de libertação a partir das micropartículas. Em hGH estabilizada, a tendência da hGH para se agregar dentro de uma micropartícula durante hidratação *in vivo* e/ou para perder actividade ou potência biológica devido à hidratação ou devido ao processo de formação de uma composição de libertação sustentada, ou devido às características químicas de uma composição de libertação sustentada, é reduzida por complexação de pelo menos um tipo de catião metálico com hGH antes desta entrar em contacto com uma solução de polímero.

A hGH estabilizada é tipicamente estabilizada contra agregação significativa *in vivo* durante o período de libertação sustentada. Agregação significativa é definida como uma quantidade de agregação que resulta em agregação de cerca de 15% ou mais da quantidade inicial de monómero hGH encerrado em cápsulas. Preferivelmente, a agregação é mantida em níveis inferiores a cerca de 5% da dose inicial de monómero hGH. Mais preferivelmente, a agregação é mantida em níveis inferiores a cerca de 2% da dose inicial.

A hGH numa composição de libertação sustentada de hGH também pode ser misturada com outros excipientes, como agentes de carga, ou agentes estabilizadores adicionais, como tampões para estabilizar a hGH durante liofilização.

Agentes de carga incluem, tipicamente, materiais inertes. Agentes de carga adequados são conhecidos dos que são experimentados na técnica.

Um polímero, ou uma matriz polimérica, adequado para a composição de libertação sustentada da presente invenção deve ser biocompatível. Um polímero é biocompatível se o polímero e quaisquer produtos de degradação do polímero não forem tóxicos para o sujeito receptor e também se não causarem efeitos perniciosos ou inconvenientes significativos no corpo do sujeito receptor, como uma reacção imunológica no local da injecção.

O polímero da composição de libertação sustentada de hGH também deve ser biodegradável. Biodegradável, como aqui definido, significa que a composição degradar-se-á ou corroer-se-á *in vivo* para formar espécies químicas mais pequenas. A degradação pode resultar, por exemplo, de processos enzimáticos, químicos e físicos.

Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis adequados incluem, por exemplo, poli(láctidos), poli(glicólidos), poli(láctidos-co-glicólidos), ácidos poli(lácticos), ácidos poli(glicólicos), ácidos poli(lácticos-co-glicólicos), policaprolactona, policarbonatos, amidas de poliéster, polianidridos, poli(aminoácidos), poliorthoésteres, policianoacrilatos, poli(p-dioxanona), poli(oxalatos) alquilénicos, poliuretanos biodegradáveis, combinações e copolímeros daqueles.

Além disso, as funções terminais do polímero podem ser modificadas. Por exemplo, os poliésteres podem ser polímeros bloqueados, desbloqueados ou uma combinação de polímeros bloqueados e desbloqueados. Um polímero bloqueado, tal como classicamente definido na técnica, tem especificamente grupos terminais carboxilo bloqueados. Em geral, o grupo bloqueante é derivado do iniciador da polimerização e é tipicamente um grupo alquilo. Um polímero desblockado, tal como

classicamente definido na técnica, tem especificamente grupos terminais carboxilo livres.

Pesos moleculares aceitáveis para os polímeros utilizados nesta invenção podem ser determinados por alguém experimentado na técnica, tomando em consideração factores como a taxa de degradação do polímero desejada, propriedades físicas como resistência mecânica, taxa de dissolução do polímero em solvente. Tipicamente, um intervalo aceitável de pesos moleculares vai de cerca de 2000 Daltons a cerca de 2 000 000 Daltons. Numa especificação preferida, o polímero é um polímero ou copolímero biodegradável. Numa especificação mais preferida, o polímero é um poli(láctido-co-glicólico) (daqui em diante "PLGA") com um quociente láctido:glicólico de cerca de 1:1 e um peso molecular de cerca de 5000 Daltons a cerca de 70 000 Daltons. Numa especificação ainda mais preferida, o PLGA utilizado na presente invenção tem um peso molecular de cerca de 6000 Daltons a cerca de 31 000 Daltons.

A quantidade de hGH contida numa dose de micropartículas de libertação sustentada, ou num dispositivo alternativo de libertação sustentada, contendo partículas de hGH biologicamente activa e estabilizada é uma quantidade terapeuticamente ou profilacticamente eficaz, que pode ser determinada por alguém experimentado na técnica tomando em consideração factores como peso do corpo, condição a ser tratada, tipo de polímero utilizado e taxa de libertação a partir do polímero.

Numa especificação, uma composição de libertação sustentada de hGH contém desde cerca de 0,01% (p/p) até cerca de 50% (p/p) de partículas de hGH biologicamente activa e estabilizada. A quantidade utilizada de tais partículas de hGH irá variar, dependendo do efeito desejado da hGH, dos níveis de libertação planeados, dos tempos aos quais a hGH deve ser libertada e do intervalo de tempo durante o qual a hGH será libertada. Uma gama preferida para a carga de partículas de hGH situa-se entre cerca de 0,1% (p/p) e cerca de 30% (p/p) de partículas de hGH. Uma gama mais preferida de carga de partículas de hGH situa-se entre cerca de 0,1% (p/p) e cerca de 20% (p/p) de partículas de hGH. A carga mais preferida de partículas de hGH biologicamente activa e estabilizada é cerca de 15% (p/p).

Noutra especificação, uma composição de libertação sustentada de hGH também contém um segundo componente de catião metálico, que não está contido nas partículas de hGH estabilizada e que se encontra disperso no polímero. O segundo componente de catião metálico contém, preferivelmente, a mesma espécie de catião metálico contida na hGH estabilizada. Alternativamente, o segundo componente de catião metálico pode conter uma ou mais espécies diferentes de catiões metálicos.

O segundo componente de catião metálico actua de forma a modular a libertação de hGH a partir da matriz polimérica da composição de libertação sustentada, por exemplo actuando como reservatório de catiões metálicos para dilatar ainda mais o período de tempo durante o qual a hGH é estabilizada por um catião metálico, aumentando assim a estabilidade da hGH na composição.

Um componente de catião metálico utilizado na modulação da libertação contém, tipicamente, pelo menos um tipo de catião metálico multivalente. Exemplos de segundos componentes de catião metálico adequados para modular a libertação de hGH incluem ou contêm, por exemplo,  $Mg(OH)_2$ ,  $MgCO_3$  (como  $4MgCO_3 \cdot Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$ ),  $ZnCO_3$  (como  $3Zn(OH)_2 \cdot 2ZnCO_3$ ),  $CaCO_3$ ,  $Zn_3(C_6H_5O_7)_2$ ,  $Mg(OAc)_2$ ,  $MgSO_4$ ,  $Zn(OAc)_2$ ,  $ZnSO_4$ ,  $ZnCl_2$ ,  $MgCl_2$  e  $Mg_3(C_6H_5O_7)_2$ . Um quociente adequado de segundo componente de catião metálico-para-polímero situa-se entre cerca de 1:99 e cerca de 1:2 por peso. O quociente óptimo depende do polímero e do segundo componente de catião metálico utilizados.

Uma matriz polimérica contendo um componente de catião metálico disperso para modular a libertação de um agente biologicamente activo a partir da matriz polimérica está descrita na Candidatura de Patente U.S. Nº 08/237 057 co-pendente, arquivada em 3 de Maio de 1994, e na Candidatura de Patente PCT PCT/US95/05511 co-pendente, os preceitos das quais são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

A composição de libertação sustentada de hGH desta invenção pode tomar várias configurações, como um filme, uma pílula, um cilindro, um disco ou uma micropartícula. Uma micropartícula, como aqui definido, inclui um componente

polimérico com um diâmetro inferior a cerca de um milímetro e com partículas de hGH estabilizada dispersas no seu interior. Uma micropartícula pode ter forma esférica, não-esférica ou irregular. É preferido que uma micropartícula seja uma micro-esfera. Tipicamente, a micropartícula terá uma dimensão adequada para injecção. Uma gama preferida de dimensões para micropartículas vai de cerca de 1 a cerca de 180 microns de diâmetro.

No método desta invenção para produzir uma composição para a libertação sustentada de hGH biologicamente activa e não-agregada, uma quantidade adequada de partículas de hGH biologicamente activa e estabilizada é dispersa numa solução de polímero.

Uma solução de polímero adequada contém entre cerca de 1% (p/p) e cerca de 30% (p/p) de um polímero biocompatível adequado, onde o polímero biocompatível está tipicamente dissolvido num solvente de polímero adequado. Preferivelmente, uma solução de polímero contém cerca de 2% (p/v) a cerca de 20% (p/v) de polímero. Uma solução de polímero contendo 5% a cerca de 10% (p/p) de polímero é a mais preferida.

Um solvente de polímero adequado, como aqui definido, é um solvente no qual o polímero é solúvel mas no qual as partículas de hGH estabilizada são substancialmente insolúveis e não-reactivas. Exemplos de solventes de polímero adequados incluem líquidos orgânicos polares, como cloreto de metileno, clorofórmio, acetato de etilo e acetona.

Para preparar partículas de hGH biologicamente activa e estabilizada, a hGH é misturada num solvente aquoso adequado com pelo menos um componente de catião metálico adequado em condições de pH adequadas para formar um complexo de catião metálico e hGH. Tipicamente, a hGH complexada estará na forma de um precipitado turvo, em suspensão no solvente. No entanto, a hGH complexada também pode estar em solução. Numa especificação ainda mais preferida, a hGH está complexada com  $Zn^{+2}$ .

Condições de pH adequadas para formar um complexo de hGH incluem, tipicamente, valores de pH entre cerca de 7,0 e cerca de 7,4. Condições de pH adequadas são atingidas, tipicamente, por utilização de um tampão aquoso como solvente, por exemplo bicarbonato de sódio.

Solventes adequados são aqueles nos quais a hGH e o componente de catião metálico, cada um deles, são pelo menos ligeiramente solúveis, como por exemplo num tampão aquoso de bicarbonato de sódio. Para solventes aquosos, é preferido que a água utilizada seja quer água desionizada quer água-para-injecção (API).

É entendido que a hGH pode estar num estado sólido ou dissolvido, antes de entrar em contacto com o componente de catião metálico. Também é entendido que o componente de catião metálico pode estar num estado sólido ou dissolvido, antes de entrar em contacto com a hGH. Numa especificação preferida, uma solução aquosa tamponada de hGH é misturada com uma solução aquosa do componente de catião metálico.

Tipicamente, a hGH complexada estará na forma de um precipitado turvo, em suspensão no solvente. No entanto, a hGH complexada também pode estar em solução. Numa especificação ainda mais preferida, a hGH está complexada com  $Zn^{+2}$ .

A hGH complexada é então seca, por exemplo por liofilização, para formar um composto de hGH estabilizada em partículas. A hGH complexada, suspensa ou em solução, pode ser liofilizada na totalidade ou pode ser dividida em volumes mais pequenos que são então liofilizados. Numa especificação preferida, a suspensão de hGH complexada é micronizada, por exemplo por utilização de um pulverizador ultrassónico, e depois é liofilizada para formar partículas de hGH estabilizada. Métodos aceitáveis para liofilizar a mistura de hGH complexada incluem aqueles conhecidos da técnica.

Preferivelmente, o diâmetro das partículas de hGH estabilizada situa-se entre cerca de 1 e cerca de 6 micrómetros. As partículas de hGH podem ser fragmentadas separadamente, como descrito na Candidatura de Patente U.S. Nº 08/006 682 co-

pendente, arquivada em 21 de Janeiro de 1993, que descreve um processo para produzir partículas pequenas de agentes biologicamente activos, a qual é aqui incorporada na sua totalidade por referência. Alternativamente, as partículas de hGH podem ser fragmentadas depois de serem adicionadas a uma solução de polímero, por exemplo por intermédio de uma sonda ultrassónica ou pulverizador ultrassónico.

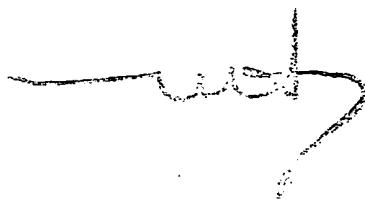
Noutra especificação, um segundo componente de catião metálico, não contido nas partículas de hGH estabilizada, também está disperso na solução de polímero.

É entendido que um segundo componente de catião metálico e hGH estabilizada podem ser dispersos numa solução de polímero sequencialmente, por ordem inversa, intermitentemente, separadamente ou por adições simultâneas. Alternativamente, um polímero, um segundo componente de catião metálico e hGH estabilizada podem ser misturados num solvente de polímero sequencialmente, por ordem inversa, intermitentemente, separadamente ou por adições simultâneas.

O método para produzir uma composição para modular a libertação de um agente biologicamente activo a partir de um polímero biodegradável está descrito em mais pormenor na Candidatura de Patente U.S. Nº 08/237 057 co-pendente .

Neste método, o solvente de polímero é então solidificado para formar uma matriz polimérica contendo uma dispersão de partículas de hGH estabilizada.

Um método adequado para produzir uma composição de libertação sustentada de hGH a partir de uma solução de polímero é o método de evaporação do solvente descrito na Patente U.S. Nº 3 737 337 atribuída a Schnoring *et al.*, Patente U.S. Nº 3 523 906 atribuída a Vranchen *et al.*, Patente U.S. Nº 3 691 090 atribuída a Kitajima *et al.*, ou Patente U.S. Nº 4 389 330 atribuída a Tice *et al.* A evaporação do solvente é um método tipicamente utilizado para produzir micropartículas de libertação sustentada de hGH.



No método de evaporação do solvente, uma solução de polímero contendo uma dispersão de partículas de hGH estabilizada é misturada (numa) ou agitada com uma fase contínua, na qual o solvente de polímero é parcialmente miscível, para formar uma emulsão. A fase contínua é, geralmente, um solvente aquoso. São muitas vezes incluídos emulsificadores na fase contínua para estabilizar a emulsão. O solvente de polímero é então evaporado durante um período de várias horas ou mais, desse modo solidificando o polímero para formar uma matriz polimérica que contém uma dispersão de partículas de hGH estabilizada.

Um método preferido para produzir micropartículas de liberação sustentada de hGH a partir de uma solução de polímero está descrito na Patente U.S. Nº 5 019 400 atribuída a Gombotz *et al.*, e na Candidatura de Patente U.S. Nº 08/443 726 correspondente, arquivada em 18 de Maio de 1995, os preceitos das quais são aqui incorporados por referência na sua totalidade. Quando comparado com outros métodos, como separação de fases, este método de formação de micro-esferas reduz, adicionalmente, a quantidade de hGH necessária para produzir uma composição de liberação sustentada com um teor específico de hGH.

Neste método, a solução de polímero contendo a dispersão de partículas de hGH estabilizada é submetida a tratamento para se criarem gotículas, onde pelo menos uma porção significativa das gotículas contém solução de polímero e as partículas de hGH estabilizada. Estas gotículas são então congeladas por meios adequados para formar micropartículas. Exemplos de métodos de tratamento da dispersão da solução de polímero para se formarem gotículas incluem dirigir a dispersão através de um pulverizador ultrassónico, pulverizador de pressão, jacto de Rayleigh, ou por outros meios conhecidos para criar gotículas a partir de uma solução.

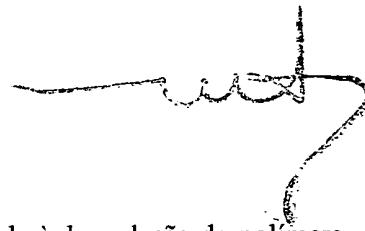
Meios adequados de congelamento de gotículas para formar micropartículas incluem dirigir as gotículas para um ou perto de um gás liquefeito, como argon líquido e azoto líquido, para formar microgotículas congeladas, que são então separadas do gás líquido. As microgotículas congeladas são depois expostas a um não-solvente líquido, como etanol ou etanol misturado com hexano ou pentano.

O solvente presente nas microgotículas congeladas é extraído na forma de um sólido e/ou líquido para o não-solvente, para formar micropartículas contendo hGH estabilizada. Misturar etanol com outros não-solventes, como hexano ou pentano, pode aumentar a taxa de extracção do solvente - acima da atingida pelo etanol isolado - de certos polímeros, como polímeros poli(láctido-co-glicólido).

Pode conseguir-se uma larga gama de dimensões de micropartículas de libertação sustentada de hGH variando as dimensões das gotículas, por exemplo alterando o diâmetro do pulverizador ultrassónico. Se forem desejadas micropartículas muito grandes, as micropartículas podem ser sujeitas a extrusão através de uma seringa directamente para o líquido frio. Aumentar a viscosidade da solução de polímero também pode aumentar as dimensões das micropartículas. O tamanho das micropartículas pode ser manipulado por este processo, por exemplo micropartículas que vão de dimensões superiores a cerca de 1000 até cerca de 1 micrómetro de diâmetro.

Outro método para produzir uma composição de libertação sustentada de hGH a partir de uma solução de polímero inclui moldagem em filme, por exemplo num molde, para formar um filme ou uma forma. Por exemplo, depois de colocar num molde a solução de polímero contendo uma dispersão de partículas de hGH estabilizada, o solvente de polímero é removido por meios conhecidos da técnica, ou então a temperatura da solução de polímero é reduzida até se obter um filme ou uma forma com um peso seco consistente. Moldagem em filme de uma solução de polímero contendo um agente biologicamente activo é descrita em mais pormenor na Candidatura de Patente U.S. Nº 08/237 057 co-pendente, os preceitos da qual são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

Crê-se que a libertação de hGH pode ocorrer por dois mecanismos diferentes. A hGH pode ser libertada por difusão através de canais preenchidos com meio aquoso, gerados na matriz polimérica por dissolução da hGH, por exemplo, ou por cavidades criadas pela remoção do solvente do polímero durante a síntese da composição de libertação sustentada.



Um segundo mecanismo é a libertação de hGH devido à degradação do polímero. A taxa de degradação pode ser controlada alterando propriedades do polímero que influenciam a sua taxa de hidratação. Estas propriedades incluem, por exemplo, o quociente de monómeros diferentes - como láctido e glicólido - que constituem o polímero; a utilização do isómero L de um monómero em vez de uma mistura racémica, e o peso molecular do polímero. Estas propriedades podem afectar a hidrofilicidade e a cristalinidade, que controlam a taxa de hidratação do polímero. Para aumentar a hidratação também é possível incorporar excipientes hidrofílicos, como sais, hidratos de carbono e surfactantes, que podem alterar a taxa de erosão do polímero.

As contribuições da difusão e/ou degradação do polímero para a libertação de hGH podem ser controladas alterando as propriedades do polímero. Por exemplo, aumentar o teor de glicólido de um polímero poli(láctido-co-glicólido) e diminuir o peso molecular do polímero podem intensificar a hidrólise do polímero, favorecendo assim uma maior libertação de hGH a partir da erosão do polímero.

Além disso, a taxa de hidrólise do polímero é intensificada em pHs não-neutros. Deste modo, pode ser adicionado um excipiente ácido ou básico à solução de polímero, utilizada para formar a micro-esfera, para alterar a taxa de erosão do polímero.

A composição desta invenção pode ser administrada a um ser humano ou outro animal por injecção, implantação (por exemplo subcutaneamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intracraniamente, intravaginalmente e intradermicamente), administração a membranas mucosas (por exemplo intranasalmente ou por intermédio de um supositório), ou distribuição *in situ* (por exemplo por intermédio de clister ou vaporização de aerossol) para fornecer a dosagem desejada de hGH, com base nos parâmetros conhecidos para tratamento com hGH dos vários estados clínicos.

A invenção será agora descrita em mais pormenor, e especificamente, pelos exemplos seguintes.

Exemplo 1Formação de Zn<sup>+2</sup>-hGH Estabilizada

Neste Exemplo utilizou-se a hormona de crescimento humano (hGH), cuja sequência de ADN está descrita na Patente U.S. 4 898 830 atribuída a Goeddel *et al.* A hormona de crescimento humano foi estabilizada por formação de complexos com zinco insolúveis.

Dissolveu-se a hGH em amostras de um tampão de bicarbonato de sódio 4 mM (pH 7,2), para formar soluções de hGH com concentrações entre 0,1 e 0,5 mM de hGH. Preparou-se uma solução de Zn<sup>+2</sup> 0,9 mM, a partir de água desionizada e acetato de zinco di-hidratado, que foi depois adicionada às soluções de hGH para formar o complexo Zn<sup>+2</sup>-hGH. Seguidamente ajustou-se o pH do complexo Zn<sup>+2</sup>-hGH para valores entre 7,0 e 7,4 por adição de ácido acético a 1%. Formou-se um precipitado turvo em suspensão, contendo o complexo Zn<sup>+2</sup>-hGH estabilizada.

A suspensão de Zn<sup>+2</sup>-hGH estabilizada foi então micronizada por intermédio de um pulverizador ultrassónico (Tipo V1A; Sonics and Materials, Danbury, CT) e foi vaporizada para uma tina de polipropileno (17 cm de diâmetro e 8 cm de profundidade) contendo azoto líquido, para formar partículas congeladas. Colocou-se a tina de polipropileno num congelador a -80°C até se evaporar o azoto líquido. As partículas congeladas, contendo Zn<sup>+2</sup>-hGH estabilizada, foram então liofilizadas para formar partículas Zn<sup>+2</sup>-hGH estabilizada.

Exemplo 2Preparação de Micro-esferas PLGA ContendohGH Biologicamente Activa e Estabilizada contra Agregação

Prepararam-se micro-esferas contendo Zn<sup>+2</sup>-hormona de crescimento humano (hGH) estabilizada a partir do polímero hidrofílico poli(láctido-co-glicólico) RG502H com grupos terminais carboxilo livres (daqui em diante denominado “PLGA-desbloqueado”) (50:50 PLGA, 9300 Dalton; Boehringer Ingelheim Chemicals, Inc.) ou de um polímero PLGA mais hidrofóbico, com grupos terminais carboxilo bloqueados

(daqui em diante denominado “PLGA-bloqueado”) (50:50 PLGA, 10 000 Dalton; Lote #115-56-1, Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL).

Dissolveu-se o polímero em cloreto de metileno à temperatura ambiente. As partículas de hGH liofilizadas foram adicionadas à solução de polímero, e também foi adicionado carbonato de zinco. Em seguida, a mistura foi sonicada para produzir uma suspensão homogénea. A suspensão foi atomizada, utilizando um pulverizador sonicador, para um leito de etanol congelado coberto por azoto líquido. O recipiente contendo as micro-esferas foi guardado a -80°C, para extrair o cloreto de metileno, e depois foi liofilizado para produzir um pó livremente fluente.

### Exemplo 3

#### Análise da Proteína hGH em Cápsulas

Determinou-se a integridade da hGH em cápsulas dissolvendo micro-esferas não-hidratadas em cloreto de metileno e acetona, recolhendo a proteína, liofilizando-a e reconstituindo-a em tampão HEPES contendo 10 mM de EDTA. Realizaram-se ensaios de controle apropriados para assegurar que o processo de extração não afectou a integridade da proteína.

Analisou-se a integridade da hGH em cápsulas medindo a percentagem de monómero hGH contida na hGH após inserção em cápsulas através de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC).

Os resultados das análises SEC relativas à integridade da hGH das micro-esferas de liberação sustentada de hGH são apresentados abaixo.

Formulação (polímero; % Carbonato de Zinco)	% Monómero (SEC)
31K desbloqueado; 6% ZnCO <sub>3</sub>	98,6
31K desbloqueado; 6% ZnCO <sub>3</sub>	99,2
31K desbloqueado; 3% ZnCO <sub>3</sub>	97,7
31K desbloqueado; 3% ZnCO <sub>3</sub>	97,8
31K desbloqueado; 1% ZnCO <sub>3</sub>	97,6
31K desbloqueado; 0% ZnCO <sub>3</sub>	97,8
31K desbloqueado; 0% ZnCO <sub>3</sub>	97,1
10K bloqueado; 1% ZnCO <sub>3</sub>	98,2
10K bloqueado; 1% ZnCO <sub>3</sub>	98,4
8K desbloqueado; 0% ZnCO <sub>3</sub>	98,5
10K bloqueado; 1% ZnCO <sub>3</sub>	98,4

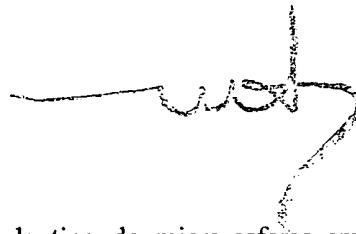
Os resultados mostraram que o processo de inserção em cápsulas não causou agregação da proteína. O rendimento percentual da proteína recuperada pelo procedimento de extracção (relativamente à quantidade medida pelo teor de azoto das micro-esferas) variou de cerca de 40 a 98%. Pensa-se que a variabilidade esteja associada à perda de material durante os passos de transferência do procedimento; o procedimento de extracção está a ser modificado para aumentar a recuperação da proteína.

#### Exemplo 4

##### Determinação do Efeito do Carbonato de Zinco na Cinética de Libertaçāo *In vitro*

As micro-esferas foram formadas como descrito no Exemplo 2 e continham 15% p/p de hGH (complexo Zn:proteína hGH 6:1), 0%, 1%, 6%, 10% ou 20% p/p de carbonato de zinco, e polímero poliláctido-co-glicolído.

Determinou-se a cinética de libertação *in vitro* das formulações de micro-esferas de libertação sustentada de hGH contendo várias concentrações de carbonato de zinco



colocando em suspensão uma alíquota (10 mg) de cada tipo de micro-esferas em diferentes amostras de 1,5 ml de tampão HEPES (Hepes 50 mM, KCl 10 mM, NaN<sub>3</sub> 0,1%) a pH 7,2, que foram depois incubadas a 37°C. Quantificou-se a quantidade de proteína libertada por amostragem do tampão 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28 dias após incubação, voltando a atestar com tampão novo depois de cada amostragem.

Desenhou-se um gráfico de percentagem cumulativa libertada (relativamente ao teor inicial de hGH na massa de partida das micro-esferas) *versus* tempo. Analisou-se o teor de monómero hGH nas amostras de proteína libertada em cada um dos períodos por cromatografia de exclusão por tamanho.

Pensa-se que o carbonato de zinco actua como um reservatório de iões zinco, sendo favorecida a formação do complexo Zn-hGH e desfavorecida a dissociação em hGH solúvel. Uma vez que a solubilidade aquosa do carbonato de zinco é baixa, a libertação de iões zinco a partir do reservatório é lenta, modulando deste modo a solubilidade da proteína.

Segundo a análise, na ausência do carbonato de zinco a taxa de libertação da hGH em cápsulas revelou-se muito elevada, e toda a proteína foi libertada num período de tempo muito curto.

#### Exemplo 5

##### Análise da hGH Depois de Degradação *in Vivo* das Micro-esferas de PLGA-Bloqueado Zn<sup>+2</sup>-hGH Estabilizada

Formaram-se micro-esferas de PLGA-bloqueado pelo método do Exemplo 2, contendo 15% p/p de Zn<sup>+2</sup>-hGH estabilizada e 0%, 6%, 10% ou 20% de ZnCO<sub>3</sub>. Injectaram-se subcutaneamente grupos de ratos de teste com amostras de 50 mg das diferentes micro-esferas de hGH. Os ratos foram sacrificados após 60 dias e excisaram-se amostras de pele dos locais de injecção. Colocaram-se as amostras de pele excisadas em Formalina Tamponada Neutra a 10% durante pelo menos 24 horas. Em seguida foram aparadas com uma lâmina, para remover o excesso de pele, e foram colocadas em PBS.

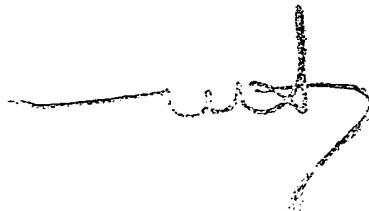
O processamento das amostras de tecido foi feito pela Pathology Associates, Inc. (Frederick, MD). As amostras de pele foram embebidas em glicometacrilato, foram seccionadas e a presença de hGH foi analisada utilizando um Estojo de Manchas HistoScan/LymphoScan (Produto #24-408M; Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY) de acordo com as intruções do fabricante. Analisaram-se as amostras de tecido para se verificar a presença ou ausência de manchas, indicativa da presença ou ausência de hGH na amostra.

Os testes efectuados a todas as amostras de pele, associadas a injecções de micro-esferas de hGH, deram resultados positivos para a presença de hGH, indicando assim que as micro-esferas de PLGA-bloqueado ainda continham hGH após 60 dias *in vivo*.

Utilizou-se o método descrito no Exemplo 2 para formar micro-esferas, inserindo em cápsulas 0% ou 15% p/p de hGH, na forma de complexo Zn:hGH, e também 0%, 1% ou 6% p/p de sal ZnCO<sub>3</sub>, em PLGA-bloqueado e em PLGA-desbloqueado.

Comparou-se a degradação *in vivo* das micro-esferas de PLGA-desbloqueado versus micro-esferas de PLGA-bloqueado, injectando amostras de micro-esferas em ratos e analisando as micro-esferas que restaram no local de injecção em vários períodos pós-injecção. Analisaram-se cada uma das amostras de micro-esferas em três ratos, em cada intervalo de tempo. No dia da administração das micro-esferas, adicionaram-se 750 µl de veículo (carboximetilcelulose (baixa viscosidade) a 3% e Tween-20 a 1% em purgante salino) a frascos contendo 50 ± 1 mg de micro-esferas. De imediato, os frascos foram agitados vigorosamente para formar uma suspensão, que foi depois aspirada para uma seringa de 1,0 cc sem agulha.

Anestesiaram-se os ratos (machos Sprague-Dawley) com uma mistura de halotano e oxigénio. Os locais de injecção (região intra-escapular) foram rapados e marcados com uma tatuagem permanente, para permitir uma excisão precisa da pele nos instantes da amostragem. Cada rato foi injectado com um frasco inteiro de micro-esferas, utilizando agulhas de calibres 18 a 21.



Em dias pré-determinados (dias 15, 30, 59 e 90 pós-injecção para os animais que receberam micro-esferas de PLGA-bloqueado, ou dias 7, 14, 21, 28 e 45 pós-injecção para os animais que receberam micro-esferas de PLGA-desbloqueado) os ratos foram sacrificados por asfixia com CO<sub>2</sub> gasoso e excisou-se a pele (incluindo micro-esferas) nos locais de injecção. Uma vez que as micro-esferas mostraram tendência para se acumularem nos locais de injecção, a presença ou ausência de micro-esferas foi determinada visualmente.

Segundo as inspecções visuais, as micro-esferas de PLGA-desbloqueado degradaram-se substancialmente mais depressa do que as micro-esferas de PLGA-bloqueado, e a adição de ZnCO<sub>3</sub> ao PLGA-bloqueado abrandou substancialmente a degradação polimérica. Por exemplo, nos ratos injectados com micro-esferas de PLGA-desbloqueado contendo 0% de hGH e 0% ou 1% de ZnCO<sub>3</sub>, não eram visíveis quaisquer micro-esferas no dia 21. Adicionalmente, para os ratos injectados com micro-esferas de PLGA-bloqueado contendo 0% de hGH e 0% de ZnCO<sub>3</sub>, algumas micro-esferas eram visíveis no dia 60 e nenhuma era visível no dia 90. Além disso, para os ratos injectados com micro-esferas de PLGA-bloqueado contendo 0% ou 15% de hGH e 6% de ZnCO<sub>3</sub>, eram visíveis micro-esferas no dia 90.

#### Exemplo 6

##### Estudos Farmacocinéticos *in Vivo* de Micro-esferas de Libertaçāo Sustentada de hGH em Ratos

Conduziram-se estudos em ratos para examinar várias formulações de micro-esferas de hGH, determinar parâmetros farmacocinéticos após administração de hGH intravenosa (IV), subcutânea (SC) e SC por bomba osmótica (Alzet), e avaliar perfis do soro e taxas de liberação *in vivo* de várias formulações de micro-esferas de hGH.

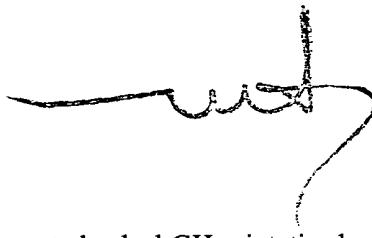
Dividiram-se os ratos Sprague-Dawley em grupos, aleatórios por peso do corpo, de três ratos cada, e administrou-se uma formulação de micro-esferas de hGH a cada grupo. Os ratos foram injectados subcutaneamente com aproximadamente 7,5 mg de hGH em 50 mg de um dos tipos das diferentes micro-esferas, em suspensão em 0,75 ml de um veículo aquoso injectável. A composição do veículo era CMC (baixa

viscosidade) a 3% e Polissorbato 20 a 1%, em NaCl a 0,9%. A dose administrada de micro-esferas foi determinada indirectamente, pesando a dose residual no frasco de injecção e corrigindo esse valor para tomar em consideração o veículo de injecção residual. Calculou-se então a dose de hGH a partir da carga de proteína das micro-esferas, determinada por análise de azoto.

Recolheram-se amostras sanguíneas em intervalos de tempo pré-determinados até 30 dias após injecção. Recolheram-se amostras de sangue de 250 µl durante as primeiras 24 horas e pelo menos 400 µl em intervalos determinados após as 24 horas. As amostras de sangue foram coaguladas, e determinaram-se as concentrações de hGH no soro por intermédio de ensaios rádio-imunológicos. Um estojo de ensaios rádio-imunológicos (RIA) da ICN foi validado e utilizado para determinar os níveis de hGH no soro dos ratos.

Para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos, administrou-se aos ratos hGH em purgante salino por injecção de *bolus* subcutâneo, intravenosamente ou via uma bomba osmótica (Modelo Alzet 2ML4) implantada subcutaneamente.

Três grupos de ratos receberam uma única injecção subcutânea de hGH em NaCl a 0,9%, a 0,5 ou 7,5 mg/kg e a um volume de dose de 1,0 ml/kg; dois grupos receberam uma única injecção intravenosa de *bolus* de hGH em solução de NaCl a 0,9%, a cerca de 1,0 mg e 5,0 mg de hGH por quilograma de peso do rato e com um volume de dose de 1,0 ml/kg. Para o estudo de bomba de Alzet, dividiram-se os ratos em quatro grupos, aleatórios por peso do corpo, de três ratos cada, aos quais se administrou uma dose de cerca de 20 mg/ml e 40 mg/ml de hGH em solução salina a 0,9%, a partir das bombas (Modelo Alzet 2002, 200 µl, libertação durante 14 dias), e com cerca de 4 mg/ml e 12 mg/ml de hGH em solução salina a 0,9%, a partir das bombas (Modelo Alzet 2ML4, 2 ml, libertação durante 28 dias). As taxas de libertação esperadas a partir das bombas correspondem a cerca de 2% e 4 a 6% da dose de hGH ProLease (cerca de 15 mg/kg) por dia, respectivamente. As bombas Alzet foram implantadas subcutaneamente na região inter-escapular, depois de imbibição durante 1-2 minutos em purgante salino esterilizado.



As formulações de micro-esferas de liberação sustentada de hGH, sintetizadas como descrito no Exemplo 2, continham 15% p/p de hGH complexada com Zn numa razão Zn:hGH de 6:1; 0%, 1%, 3% ou 6% p/p de carbonato de zinco, e PLGA 8K desbloqueado, PLGA 10K bloqueado ou PLGA 31K desbloqueado.

Para avaliar as várias formulações de liberação sustentada de hGH, usaram-se os índices *in vivo* C<sub>max</sub>, C<sub>d5</sub> e C<sub>max</sub>/C<sub>d5</sub>, onde C<sub>max</sub> é a concentração máxima no soro observada e C<sub>d5</sub> é a concentração no soro no dia 5, que deve aproximar a concentração de estado estacionário. Os resultados foram os seguintes:

Formulação	"Jorro" <i>in vitro</i> (%)	% Monómero Dia 7	C <sub>max</sub> (ng/ml)	C dia 5 (ng/ml)	C <sub>max</sub> /Cd5
PLGA 8K desbloqueado 0% ZnCO <sub>3</sub>	22,0 ± 0,9	99,3*	323,3 ± 98,6	20,4 ± 14,2	19,5 ± 10,6
PLGA 8K desbloqueado 1% ZnCO <sub>3</sub>	16,4 ± 1,6	97,3*	309,0 ± 67,1	20,4 ± 14,2	39,5 ± 17,7
PLGA 8K desbloqueado 3% ZnCO <sub>3</sub>	15,9 ± 6,9	98,7	670,5 ± 244,4	9,0 ± 4,2	44,8 ± 22,6
PLGA 8K desbloqueado 6% ZnCO <sub>3</sub>	17,6 ± 2,7	99,3	358,0 ± 58,9	18,8 ± 14,7	42,4 ± 6,8
PLGA 31K desbloqueado 0% ZnCO <sub>3</sub>	12,3 ± 1,1	98,2	592 ± 318,2	4,5 ± 1,5	132,5 ± 47,9
PLGA 31K desbloqueado 1% ZnCO <sub>3</sub>	11,4 ± 1,3	98,8	432,7 ± 91,6	5,1 ± 0,3	84,1 ± 14,9
PLGA 31K desbloqueado 3% ZnCO <sub>3</sub>	7,9 ± 1,9	99,4	643,6 ± 203,9	8,0 ± 2,6	93,3 ± 62,0
PLGA 31K desbloqueado 6% ZnCO <sub>3</sub>	15,8 ± 0,5	99,8	1691,8 340,0 ±	6,6 ± 0,8	262,2 ± 83,5
PLGA 10K desbloqueado 1% ZnCO <sub>3</sub>	12,7 ± 0,1	99,3	615,9 ± 384,3	4,5 ± 1,0	155,0 ± 126,8
PLGA 10K desbloqueado 3% ZnCO <sub>3</sub>	18,1 ± 3,2	99,6	1053,2 ± 293,3	3,6 ± 0,8	291,7 ± 71,1
PLGA 10K desbloqueado 6% ZnCO <sub>3</sub>	9,9 ± 1,4	99,0	1743,5 ± 428,4	4,9 ± 2,7	516,1 ± 361,6

\* Valor obtido de amostra em duplicado da mesma formulação.

Os resultados do estudo mostraram que os dois polímeros desbloqueados (8K e 31K) evidenciaram cinéticas de libertação *in vivo* diferentes, comparativamente à formulação original que usou PLGA 10K bloqueado e 6% p/p de carbonato de zinco. Os valores de C<sub>max</sub> revelaram-se geralmente mais baixos com as formulações de polímero desbloqueado do que com a formulação principal, o que sugeriu que o "jorro" *in vivo*

possa ser mais baixo com as formulações de polímero desbloqueado. O “jorro” foi definido como a percentagem de hGH libertada nas primeiras 24 horas após injecção. Os valores do “jorro” *in vitro* situaram-se entre 8-22%. O teor em carbonato de zinco das formulações não aparentou exercer um efeito sobre o “jorro” ou sobre o perfil de libertação *in vitro*.

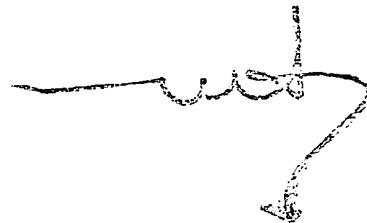
As concentrações no soro entre os dias 4 e 6 mantiveram-se a um nível razoavelmente constante acima dos níveis de base (ou dos níveis pré-sangria) com as formulações de polímero desbloqueado, enquanto as concentrações no soro com as formulações bloqueadas, nos mesmos intervalos de tempo, situaram-se perto dos níveis de base. Os dados da libertação *in vitro* até 7 dias mostraram que a proteína de hGH libertada era monomérica. Não puderam ser obtidos dados úteis após o dia 6 devido à formulação de anticorpos anti-hGH nos ratos.

#### Exemplo 7

##### Estudo Farmacocinético do Macaco Rhesus

O objectivo deste estudo em primatas foi avaliar os perfis farmacocinéticos de diferentes formulações de libertação sustentada de hGH, por comparação com métodos mais tradicionais de administrar hGH (por exemplo injecções sc de *bolus*, injecções sc diárias e injecção sc combinada com a utilização de uma bomba osmótica), e determinar qual a formulação de libertação sustentada de hGH que produz o perfil óptimo de concentração sanguínea de hGH.

As formulações para as micro-esferas de libertação sustentada de hGH testadas foram 1) 15% de hGH (complexada com Zn numa razão Zn:hGH de 6:1), 6% p/p de carbonato de zinco e PLGA 10K bloqueado; 2) 15% de hGH (complexada com Zn numa razão Zn:hGH de 6:1), 1% p/p de carbonato de zinco e PLGA 8K desbloqueado (polímero PLGA “RG502H”), e 3) 15% de hGH (complexada com Zn numa razão Zn:hGH de 6:1), 1% p/p de carbonato de zinco e PLGA 31K desbloqueado (polímero PLGA “RG503H”).



Formaram-se grupos de quatro macacos e cada animal recebeu uma única injecção subcutânea, na região cervical dorsal, no Dia 1. Administrou-se a cada macaco uma dose de 160 mg de micro-esferas de libertação sustentada de hGH (24 mg de hGH) em 1,2 ml de veículo de injecção, utilizando uma agulha de calibre 20. O veículo de injecção era um veículo aquoso contendo Carboximetilcelulose (sal de sódio) a 3% p/v, Tween 20 (Polissorbato 20) a 1% v/v e cloreto de sódio a 0,9%.

Planeou-se a dose de hGH de modo a fornecer concentrações mensuráveis de hGH no soro, para análise farmacocinética. Para se obterem parâmetros farmacocinéticos, incluiram-se grupos de estudo adicionais de quatro macacos cada, especificamente 1) uma única injecção subcutânea (24 mg hGH), 2) injecções subcutâneas diárias (24 mg/28 dias = 0,86 mg hGH/dia), 3) uma injecção subcutânea (3,6 mg hGH) combinada com uma bomba osmótica Alzet (20,4 mg hGH) (dose total de 24 mg hGH) e 4) uma injecção subcutânea do veículo de injecção, como controle (só foram utilizados 3 macacos para o grupo de controle do veículo).

Recolheram-se amostras sanguíneas nos seguintes períodos, para análise de hGH, IGF1, IGFBP3 e anticorpos anti-hGH: -7, -5, -3, pré-dose e 0,5, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 24, 28, 32 e 48 horas, 5, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 25, 28, 41, 44, 47, 50, 53, 56 dias pós-dose.

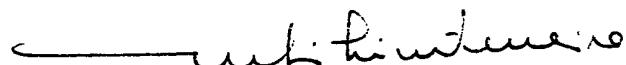
Mediram-se então as concentrações de IGF-1 e hGH no soro. Utilizou-se um estojo IRMA da RADIM (distribuido por: Wein Laboratories, P.O. Box 227, Succasunna, NJ) para quantificar a hGH no soro dos macacos. O banco de ensaios IRMA tinha um limite de quantificação em tampão PBS de 0,1 ng/ml e em soro reunido de macaco rhesus juvenil de 1,5 ng/ml, com um nível GH basal de cerca de 4 ng/ml.

O banco de ensaios IRMA foi validado para a gama de concentrações 1,5 - 75 ng/mL para soro reunido de macaco rhesus juvenil. A precisão e rigor das medições situam-se no intervalo  $\pm 10\%$ .

Os resultados mostraram que as micro-esferas de libertação sustentada de hGH estavam a libertar níveis significativos e sustentados de hGH durante um período de um mês, ao passo que as injecções subcutâneas não conseguiram manter os mesmos níveis no soro.

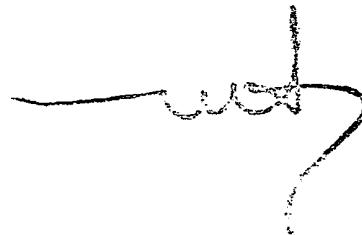
O perfil de IGF-1 no soro mostrou que as concentrações de IGF-1 no soro elevaram-se acima dos valores de base entre os dias 2 e 29 após administração das micropartículas. Estes resultados mostram que a hGH estava a ser libertada em quantidade suficiente, a partir das micro-esferas de libertação sustentada de hGH, para produzir um efeito farmacodinâmico. Estes resultados também indicam que a hGH libertada era biologicamente activa, o que sugere que a inserção em cápsulas não afectou adversamente a biopotência da hGH.

Lisboa, 21 NOV. 2001



**Maria Silvina Ferreira  
ADVOGADA**

Agente Oficial de Propriedade Industrial  
R. Castilho, 50 - 5º - 1250 - 071 LISBOA  
Tel. 2138150 50 - Fax. 21383 1150



## REIVINDICAÇÕES

1. Composição para a libertação sustentada da hormona de crescimento humano, incluindo:
  - a) um polímero biocompatível, e
  - b) partículas de catião metálico-hormona de crescimento humano complexada, onde a razão molar de catião metálico para proteína é superior a 4:1 e vai até 10:1, e onde a composição não está sob a forma de micro-esferas poli(láctido-co-glicólido) contendo partículas de 1 a 16% p/p de Zn<sup>+2</sup>-hormona de crescimento humano estabilizada com uma razão molar de Zn<sup>+2</sup> para proteína de 6:1.
2. Composição da Reivindicação 1, onde a razão molar é pelo menos 6:1.
3. Composição das Reivindicações 1 ou 2, onde o catião metálico é Zn(II).
4. Composição de qualquer uma das reivindicações precedentes, onde o catião metálico é adicionado à hormona de crescimento humano na forma de um sal solúvel em água; opcionalmente, onde o catião metálico é adicionado à hormona de crescimento humano na forma de acetato de zinco.
5. Composição de qualquer uma das reivindicações precedentes, onde as referidas partículas de catião metálico-hormona de crescimento humano complexada estão dispersas no referido polímero biocompatível; opcionalmente, onde o referido polímero é seleccionado do grupo que consiste em poli(láctido), poli(glicólido), poli(láctido-co-glicólido), ácido poli(láctico), ácido poli(glicólico), policaprolactona, policarbonato, amida de poliéster, polianidrido, poli(aminoácido), poliortoéster, policianoacrilato, poli(dioxanona), poli(oxalato) alquilénico, poliuretano, combinações e copolímeros daqueles.
6. Composição de qualquer uma das reivindicações precedentes, onde as partículas de catião metálico-hormona de crescimento humano complexada estão presentes

no referido polímero numa concentração entre cerca de 0,1% e cerca de 30% por peso, preferivelmente entre cerca de 0,1% e cerca de 20% por peso, e mais preferivelmente as partículas de catião metálico-hormona de crescimento humano complexada estão presentes no referido polímero numa concentração de cerca de 15% por peso.

7. Composição de qualquer uma das reivindicações precedentes, onde o polímero biocompatível também inclui um componente de catião metálico.
8. Composição da Reivindicação 7, onde o catião metálico do componente de catião metálico é quer (a) Zn(II) e, opcionalmente, o componente de catião metálico é seleccionado do grupo que consiste em ZnCO<sub>3</sub>, Zn<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>, Zn(OAc)<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> e ZnCl<sub>2</sub>, quer (b) Mg(II) e, opcionalmente, o componente de catião metálico é seleccionado do grupo que consiste em Mg(OH)<sub>2</sub>, MgCO<sub>3</sub>, Mg<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>, Mg(OAc)<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> e MgCl<sub>2</sub>.
9. Composição da Reivindicação 8, onde o quociente de componente de catião metálico para polímero se situa entre cerca de 1:99 e cerca de 1:2 por peso; preferivelmente é cerca de 1% por peso.
10. Composição de qualquer uma das reivindicações precedentes para utilização na preparação de um medicamento para terapia.

Lisboa, 21 NOV. 2001

Maria Silvina Ferreira

Maria Silvina Ferreira  
ADVOGADA  
Agente Oficial de Propriedade Industrial  
R. Castilho, 50 - 5º - 1250 - 071 LISBOA  
Tel. 21 38150 50 - Fax. 21 383 1150