



**(11) BR 112012016459-7 B1**



\* B R 1 1 2 0 1 2 0 1 6 4 5 9 B 1 \*

**(22) Data do Depósito: 19/08/2010**

**República Federativa do Brasil**

Ministério da Economia

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(45) Data de Concessão: 14/01/2020**

**(54) Título:** COMPOSTO FARMACÊUTICO PARENTERAL DE AÇÃO PROLONGADA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SAL DE GLATIRÂMERO FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL

**(51) Int.Cl.:** A61K 38/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 04/01/2010 US 61/291,928.

**(73) Titular(es):** MAPI PHARMA LIMITED.

**(72) Inventor(es):** EHUD MAROM; SHAI RUBNOV.

**(86) Pedido PCT:** PCT IL2010000679 de 19/08/2010

**(87) Publicação PCT:** WO 2011/080733 de 07/07/2011

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 03/07/2012

**(57) Resumo:** SISTEMA DE DEPÓSITO COMPREENDENDO GLATIRÂMERO OU UM SAL FARMACOLOGICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO. A presente invenção provê composto farmacêuticos parentais de ação prolongada compreendendo uma quantia terapeuticamente efetiva de glatirâmero. Em particular, a presente invenção provê um composto farmacêutico de ação prolongada compreendendo uma quantia terapeuticamente efetiva de acetato de glatirâmero sob a forma depot adequada para administrar em um local aceitável medicamente em um sujeito com necessidade deste. A forma depot é adequada para implantação ou injeção subcutâneo ou intramuscular.

**COMPOSTO FARMACÊUTICO PARENTERAL DE AÇÃO PROLONGADA,  
COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SAL DE GLATIRÂMERO  
FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL  
CAMPO DA INVENÇÃO**

5 A presente invenção refere-se a formas de dosagem de longa ação de acetato de glatirâmero e outros sais farmacologicamente aceitáveis de glatirâmero. Particularmente preferidos são sistemas de depósito e outros sistemas implantáveis para liberação prolongada do acetato de glatirâmero.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

10 **Acetato de glatirâmero**

O copolímero-1, também conhecido como acetato de glatirâmero e comercializado sob o nome comercial Copaxone®, compreende os sais de acetato de polipeptídeos contendo ácido L-glutâmico, L-alanina, L-tirosina e L-lisina. As frações molares médias dos aminoácidos são 0,141, 0,427, 0,095 e 0,338, 15 respectivamente, e o peso molecular médio de copolímero-1 é entre daltons. Quimicamente, o acetato de glatirâmero é designado polímero de ácido L-glutâmico com L-alanina, L-lisina e L-tirosina e acetato (sal). Sua fórmula estrutural é:

(Glu, Ala, Lys, Tyr)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>COOH

(C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>\_C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>\_C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>\_C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)<sub>x</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [CAS - 147245-92-9], razão 20 aproximada Glu<sub>14</sub>Ala<sub>43</sub>Tyr<sub>10</sub>Lyz<sub>34</sub>x(CH<sub>3</sub>COOH)<sub>20</sub>. Copaxone® é uma solução clara, incolor a levemente amarelada, estéril e epirogênica para injeção subcutânea. Cada mililitro contém 20 mg de acetato de glatirâmero e 40 mg de manitol. A escala de pH da solução é aproximadamente 5,5 a 7,0.

**Mecanismo de Ação**

25 O acetato de glatirâmero é um polímero aleatório (massa molecular média de 6,4 kD) composto por quatro aminoácidos encontrados na proteína básica da mielina. O mecanismo de ação para o acetato de glatirâmero é desconhecido, embora algumas propriedades imunológicas importantes deste copolímero tenham surgido. A administração de copolímero-1 desloca a população de células 30 T das células pró-inflamatórias Th1 para células Th2 reguladoras que suprimem a resposta inflamatória (etiqueta de FDA Copaxone®). Dada a sua semelhança com a proteína básica da mielina, o copolímero-1 também pode agir como um chamariz, desviando uma resposta autoimune contra a mielina. A integridade da

barreira hemato-encefálica, no entanto, não é significativamente afetada pelo copolímero-1, pelo menos não nas fases iniciais do tratamento.

Copolímero-1 é um não-autoantígeno que foi demonstrado para suprimir a 5 encefalomielite alérgica experimental (EAE) induzida por vários encefalítogenos incluindo homogenato de medula espinhal de rato (MSCH), que inclui todos os 10 antígenos da mielina, como a proteína básica de mielina (MBP) (Sela M *et al.*, Bull Inst Pasteur (1990) 88 303-314), proteína proteolipídica (PLP) (Teitelbaum D *et al.*, J Neuroimmunol (1996) 64 209-217) e glicoproteína oligodendrócito de mielina (MOG) (Ben-Nun A *et al.*, J Neurol (1996) 243 (Suppl 1) S14-S22) em uma variedade de espécies. EAE é um modelo aceito para esclerose múltipla.

Copolímero-1 tem demonstrado ser ativo quando injetado 15 subcutaneamente, intraperitonealmente, intravenosamente ou intramuscularmente (Teitelbaum D *et al.*, Eur J Immunol (1971) 1 242-248; Teitelbaum D *et al.*, Eur J Immunol (1973) 3 273-279). Em ensaios clínicos fase II, 20 injeções subcutâneas diárias de copolímero-1 foram encontradas para retardar a progressão da deficiência e reduzir a taxa de recaída em esclerose múltipla remitente exacerbada (Johnson KP, Neurology (1995) 1 65-70; [www.copaxone.com](http://www.copaxone.com)). Terapia de copolímero-1 está atualmente limitada à administração subcutânea diária. Tratamento com copolímero-1 pela ingestão ou inalação é divulgado na US 6.214.791, mas estas vias de administração não têm mostrado atingir a eficácia clínica em pacientes humanos.

### **Eficácia**

Evidências que apoiam a eficácia do acetato de glatirâmero em diminuir a 25 frequência de recidivas em pacientes com Esclerose Múltipla Relapsa-Remitente (RRMS) deriva de dois ensaios controlados por placebo, os quais utilizaram uma dose de 20 mg/dia de acetato de glatirâmero. Nenhuma outra dose ou regime de dosagem tem sido estudada em ensaios controlados por placebo de RR MS 30 ([www.copaxone.com](http://www.copaxone.com)). Um ensaio comparativo da dose de 20 mg aprovadas e a dose de 40 mg não mostrou nenhuma diferença significativa na eficácia entre essas doses (The 9006 trial; Cohen JA *et al.*, Neurology (2007) 68 939-944). Vários ensaios clínicos em acetato de glatirâmero estão em andamento. Estes incluem estudos com uma dose maior de acetato de glatirâmero (40 mg - the FORTE study); estudos em pacientes com Síndrome Isolada Clinicamente (the

PreCISE study), bem como numerosos protocolos de combinação e indução, nos quais o acetato de glatirâmero é dado junto com ou seguindo outro produto ativo.

### **Efeitos colaterais**

Atualmente, todos os tratamentos especificamente aprovados da esclerose 5 múltipla envolvem auto injeção da substância ativa. Problemas locais de injeção observados frequentemente incluem irritação, hipersensibilidade, inflamação, dor e até mesmo necrose (no caso do tratamento de interferon 1 $\beta$ ) e um baixo nível de adesão do paciente.

Efeitos colaterais incluem geralmente um nódulo no local da injeção 10 (reação local de injeção), dores, febre e calafrios. Estes efeitos colaterais são geralmente leves na natureza. Ocasionalmente, uma reação ocorre minutos após a injeção, em que há rubor, falta de ar, ansiedade e taquicardia. Estes efeitos colaterais desaparecem dentro de trinta minutos. Ao longo do tempo, pode-se 15 desenvolver um dente visível no local da injeção, devido à destruição local do tecido adiposo, conhecido como lipoatrofia. Portanto, um método alternativo de administração é desejável.

Efeitos colaterais mais graves têm sido relatados para acetato de glatirâmero, de acordo com os rótulos de prescrição do FDA, estes incluem 20 efeitos colaterais graves para o sistema cardiovascular do corpo, sistema digestivo (incluindo o fígado), sistema sanguíneo e linfático, sistema musculoesquelético, sistema nervoso, sistema respiratório, sentidos especiais (em especial os olhos), sistema urogenital; também têm sido relatados distúrbios metabólicos e nutricionais; no entanto, uma ligação entre acetato de glatirâmero e 25 esses efeitos adversos não foi definitivamente estabelecida (FDA Copaxone® label).

### **Sistemas de depósito**

A via parenteral por injeção intravenosa (IV), intramuscular (IM) ou 30 subcutânea (SC) é a forma mais comum e eficaz de entrega para drogas de pequeno como também de grande peso molecular. No entanto, dor, desconforto e inconveniência devidos às agulhas torna esta modalidade de entrega da droga a menos preferida pelos pacientes. Portanto, qualquer tecnologia de entrega de droga que possa, no mínimo, reduzir o número total de injeções, é o preferido. Tais reduções na frequência da dosagem de droga podem, na prática, ser

alcançadas através do uso de formulações *depot* injetável que são capazes de liberar drogas de forma lenta, mas previsível, e consequentemente melhorar a conformidade. Para a maioria das drogas, dependendo da dose, pode ser possível reduzir a frequência de injeção, de diária para uma ou duas vezes ao 5 mês, ou mesmo mais longa (6 meses). Além de melhorar o conforto do paciente, injeções menos frequentes de drogas sob a forma de formulações *depot* suavizam o perfil de concentração-tempo de plasma, eliminando as colinas e vales. Tal suavização de perfis de plasma tem o potencial para não apenas aumentar o benefício terapêutico na maioria dos casos, mas também para reduzir 10 quaisquer eventos indesejados, tais como imunogenicidade etc., frequentemente associados às drogas de grande peso molecular.

Micropartículas, implantes e géis são as formas mais comuns de dispositivos poliméricos biodegradáveis usados na prática para prolongar a liberação das drogas no corpo. Micropartículas são suspensas em meio aquoso 15 antes da injeção e uma pode carregar até 40% de sólidos em suspensão. Formulações de haste/implante são entregues ao tecido SC/IM com o auxílio de agulhas especiais no estado seco, sem a necessidade de um meio aquoso. Esse recurso de hastes/implantes permite maiores massas de formulação, bem como conteúdo de droga a ser entregue. Além disso, em hastes/implantes, os 20 problemas de explosão inicial são minimizados devido à área muito menor em implantes comparados com as micropartículas. Além de sistemas biodegradáveis, existem implantes não-biodegradáveis e bombas de infusão que podem ser usadas fora do corpo. Implantes não-biodegradáveis requerem a visita de um médico não só para a implantação do dispositivo no tecido SC/IM, mas também 25 para removê-los após o período de liberação de drogas.

Composições injetáveis contendo preparações de micropartículas são particularmente suscetíveis a problemas. Suspensões de micropartículas podem conter até 40% de sólidos em comparação com 0,5-5% de sólidos em outros tipos de suspensões injetáveis. Além disso, micropartículas usadas em produtos *depot* 30 injetáveis , variam em tamanho até cerca de 250 $\mu$ m (em média, 60-100 $\mu$ m), em comparação com um tamanho de partícula inferior a 5 $\mu$ m recomendado para administração IM ou SC. A maior concentração de sólidos, bem como o maior tamanho de partícula sólida, requerem maior tamanho de agulha (cerca de calibre

18-21) para injeção. Em geral, apesar de utilizações pouco frequentes de agulhas maiores e desconfortáveis, pacientes ainda preferem formas de dosagem administradas menos frequentemente a injeções de drogas diárias com uma agulha menor.

5 Poliésteres biodegradáveis de poli(ácido láctico) (PLA) e copolímeros de lactídeo e glicólido conhecidos como poli (lactídeo-co-glicólido) (PLGA) são os polímeros mais comuns utilizados em formas de dosagem biodegradáveis. PLA é molécula hidrofóbica e PLGA degrada mais rapidamente do que o PLA devido à presença de mais grupos deglicólido hidrofílico. Estes polímeros biocompatíveis  
10 sofrem clivagem hidrolítica, aleatória e não enzimática das ligações éster para formar ácido láctico e ácido glicólico, que são compostos metabólicos normais no corpo. Suturas absorvíveis, clipe e implantes são as primeiras aplicações destes polímeros. Southern Research Institute desenvolveu a primeira sutura sintética, absorvível (Dexon®) em 1970. A primeira patente descrevendo o uso de  
15 polímeros PLGA em uma forma de dosagem de liberação sustentada apareceu em 1973 (US 3.773.919).

Hoje, os polímeros PLGA estão comercialmente disponíveis a partir de vários fornecedores; Alkermes (polímeros de Medisorb), Absorbable Polymers International [anteriormente Birmingham Polymers polímeros (uma divisão da  
20 Durect)], Purac e Boehringer Ingelheim. Além de polímeros PLGA e PLA, polímeros celulósicos naturais como amido, derivados de amido, dextran e polímeros sintéticos não-PLGA, também estão sendo explorados como polímeros biodegradáveis em tais sistemas.

Neste momento, formas de dosagem de atuação não longa de acetato de  
25 glatirâmero estão disponíveis. Esta é uma grande necessidade médica não atendida, já que estas formulações seriam extremamente benéficas para muitos pacientes, particularmente para aqueles com sintomas neurológicos ou deficiências físicas.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

30 A presente invenção provê composições farmacêuticas parenterais de ação prolongada, compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um sal farmaceuticamente aceitável de glatirâmero, por exemplo, acetato de glatirâmero. Em particular, a presente invenção provê uma composição

farmacêutica de ação prolongada, compreendendo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de sal de glatirâmero em forma de *depot*, adequada para administração parenteral em um local medicamente aceitável em um indivíduo com necessidade do sal de glatirâmero. A presente invenção ainda provê um 5 método de tratamento da esclerose múltipla, compreendendo a administração parenteral ou implantação de uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um sal farmaceuticamente aceitável de glatirâmero, preferencialmente acetato de glatirâmero.

Inesperadamente, agora foi descoberto que as composições farmacêuticas 10 de ação prolongada, de acordo com os princípios da presente invenção, provêem igual ou maior eficácia terapêutica para as formas de dosagem injetável diária disponíveis comercialmente, com gravidade e/ou incidência reduzida de efeitos colaterais no local e/ou nos níveis sistêmicos.

De acordo com algumas modalidades, o acetato de glatirâmero 15 comprehende o sal acetato de L-alanina, ácido L-glutâmico, L-lisina e L-tirosina nas proporções molares de 0,14 de ácido glutâmico, cerca de 0,43 de alanina, cerca de 0,10 de tirosina e cerca de 0,33 de lisina.

De acordo com outras modalidades, o acetato de glatirâmero ou outro sal 20 farmaceuticamente aceitável de glatirâmero comprehende cerca de 15 a 100 aminoácidos.

De acordo com determinadas modalidades, o *depot* implantável é adequado para implantação subcutânea ou intramuscular.

De acordo com modalidades alternativas, a composição farmacêutica 25 parenteral de ação prolongada comprehende um portador biodegradável ou não-biodegradável farmaceuticamente aceitável para sais de glatirâmero, tais como acetato de glatirâmero.

De acordo com algumas modalidades, o portador é selecionada a partir de 30 PLGA, PLA, PGA, policaprolactona, polihidroxibutirato, poliortoésteres, polialquaneanidridos, gelatina, colágeno, celulose oxidada e polifosfazeno. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção.

De acordo com determinas modalidades, composições farmacêuticas de ação prolongada da presente invenção estão sob a forma de micropartículas, preparadas por um processo de dupla emulsificação água em água e óleo em

água. Em modalidades atualmente preferenciais, as composições farmacêuticas de ação prolongada da presente invenção compreendem uma fase aquosa interna compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um sal farmaceuticamente aceitável de glatirâmero, uma fase polimérica imiscível em água compreendendo um portador selecionado a partir de um polímero biodegradável e de um polímero não-biodegradável, e uma fase aquosa externa. Em outras modalidades atualmente preferenciais, a fase de polímeros imiscíveis em água compreende um polímero biodegradável selecionado a partir de PLA e PLGA. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção. Em 10 modalidades adicionais, a fase aquosa externa compreende tensoativo selecionado a partir de álcool polivinílico (PVA), polissorbato, copolímeros de bloco de óxido de polipropileno de óxido de etileno e ésteres de celulose. Cada possibilidade representa uma personificação separada da invenção.

A presente invenção abrange o uso de acetato de glatirâmero ou de 15 qualquer outro sal farmaceuticamente aceitável de glatirâmero em forma de *depot* adequada para implantação em uma pessoa com necessidade do sal de glatirâmero para o tratamento da esclerose múltipla.

A presente invenção abrange, adicionalmente, a utilização do *depot* implantável de acetato de glatirâmero adequado para prover a liberação 20 prolongada ou a ação prolongada do glatirâmero em um indivíduo.

Dentro do escopo da presente invenção, um sal farmaceuticamente aceitável de glatirâmero, sob a forma de *depot*, é adequado para uso no tratamento da esclerose múltipla ou no provimento de liberação prolongada ou ação prolongada de glatirâmero em um indivíduo.

25 A invenção também abrange a combinação de acetato de glatirâmero com pelo menos uma droga adicional, de preferência, um imunossupressor, particularmente fingolimod.

De acordo com algumas modalidades, a composição farmacêutica de ação 30 prolongada é adequada para uma dose programada a partir de uma vez semanal até uma vez a cada 6 meses.

De acordo com determinadas modalidades, a composição é adequada para a dosagem de uma vez a cada duas semanas até uma vez mensalmente.

De acordo com algumas modalidades, as composições de ação prolongada ação prolongada compreendem uma dose entre 20-750 mg de acetato de glatirâmero por injeção.

Exemplos específicos de composições de ação prolongada incluem 5 microesferas biodegradáveis ou não-biodegradáveis, implantes de qualquer forma geométrica adequada, hastes implantáveis, cápsulas implantáveis, anéis implantáveis, géis de liberação prolongada e matrizes erodíveis. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção.

Modalidades adicionais e o escopo completo da aplicabilidade da presente 10 invenção ficarão evidentes a partir da descrição detalhada dada adiante. No entanto, deve ser entendido que a descrição detalhada e os exemplos específicos, enquanto indicando modalidades preferenciais da invenção, são dadas a título de ilustração apenas, uma vez que várias alterações e modificações 15 dentro do espírito e do escopo da invenção se tornarão aparentes aos versados na técnica a partir desta descrição detalhada.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

**Figura 1.** Liberação de acetato de glatirâmero a partir de formulações de 20 micropartículas de PLGA MPG-02 – 07 em PBS a 37°C. Dados representados são normalizados para a solução de peptídeo padrão armazenada nas mesmas condições.

**Figura 2.** Liberação do acetato de glatirâmero a partir de formulações de 25 micropartículas de PLGA MPG-05R, 08-11 e sal de succinato de tocoferol de glatirâmero (1:1) em PBS a 37°C. Dados representados são normalizados para a solução de peptídeo padrão armazenada nas mesmas condições.

**Figura 3.** Liberação de acetato de glatirâmero a partir de formulações de 30 micropartículas de PLGA MPG-12-15, em PBS a 37°C. Os dados apresentados são normalizados para a solução de peptídeo padrão armazenada nas mesmas condições.

**Figura 4.** Liberação de acetato de glatirâmero a partir de formulações de 35 micropartículas de PLGA MPG-14SU-1 e MPG-15SU-1 in vitro em PBS a 37°C, pH 7,4.

**Figura 5.** Liberação de acetato de glatirâmero a partir de formulações de micropartículas de PLGA MPG-14SU-2 e MPG-15SU-2 in vitro em PBS a 37°C, pH 7,4.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5        A presente invenção provê preparações farmacêuticas parenterais de ação prolongada de sais farmaceuticamente aceitáveis de glatirâmero, preferencialmente acetato de glatirâmero que proporciona igual ou maior eficácia terapêutica para as injeções diárias e, portanto, resulta em melhor adesão do paciente. Além de proporcionar o mesmo efeito terapêutico, as injeções ou  
10      implantes de ação prolongada reduzem os efeitos colaterais de glatirâmero (locais e/ou sistêmicos), resultantes das frequentes injeções.

De acordo com um primeiro aspecto, a presente invenção provê uma composição farmacêutica parenteral de ação prolongada compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de acetato de glatirâmero ou qualquer outro  
15      sal farmaceuticamente aceitável de glatirâmero. O termo "parenteral", como usado neste documento, refere-se a rotas selecionadas de subcutânea (SC), intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica (ID), intraperitoneal (IP) e assim por diante. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção. O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" neste documento destina-se a qualificar a  
20      quantidade de copolímero que vai atingir o objetivo de alívio dos sintomas da esclerose múltipla. Doses adequadas incluem, mas não estão limitadas a, 20-750 mg para cada formulário de dosagem. No entanto, entende que a quantidade de copolímero administrado será determinada por um médico, de acordo com vários parâmetros, incluindo a rota escolhida de administração, a idade, peso e a  
25      gravidade dos sintomas dos pacientes. De acordo com várias modalidades da presente invenção, a quantidade terapeuticamente eficaz da pelo menos um copolímero varia de cerca de 1 mg a cerca de 500 mg/dia. Como alternativa, tais quantidades terapeuticamente eficazes da pelo menos um copolímero são de cerca de 20 mg a cerca de 100 mg/dia.

30       Em outro aspecto, a presente invenção provê uma composição farmacêutica de ação prolongada compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de acetato de glatirâmero ou qualquer outro sal farmaceuticamente aceitável de glatirâmero em uma forma de *depot* apropriada

para administração em um local medicamente aceitável em um indivíduo com necessidade de acetato de glatirâmero. O termo "ação prolongada" como usado aqui, refere-se a uma composição que proporciona liberação prolongada, sustentada ou estendida do sal glatirâmero para a circulação sistêmica geral de 5 um indivíduo ou para locais de ação em um indivíduo. Este termo ainda pode se referir a uma composição que fornece duração prolongada, sustentada ou estendida da duração da ação (farmacocinética) do sal glatirâmero em um indivíduo. Em particular, as composições farmacêuticas de ação prolongada da 10 presente invenção fornecem um regime de dosagem que varia de uma vez por semana a cada 6 meses. De acordo com modalidades atualmente mais preferíveis, o regime de dosagem varia de uma vez por semana, duas vezes por mês (aproximadamente uma vez a cada 2 semanas) a uma vez por mês.. Dependendo da duração da ação necessária, cada *depot* ou dispositivo 15 implantável da presente invenção normalmente conterá entre cerca de 20 e 750 mg do ingrediente ativo, projetado para ser lançado durante um período, que varia de um par de semanas a vários meses.

Em algumas modalidades, as formulações *depot* da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, suspensões de glatirâmero ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo na fase de água, óleo ou cera; complexos 20 polieletrólico pouco solúveis de glatirâmero ou de um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, matrizes formadoras de gel "in situ" com base na combinação de solventes miscíveis em água com glatirâmero ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo; e micropartículas poliméricas 25 biodegradáveis com glatirâmero incorporado ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção. Em particular, as composições da presente invenção estão sob a forma de micropartículas injetáveis, onde o glatirâmero ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo é aprisionado em um carregador biodegradável ou não-biodegradável. As composições de micropartículas da presente invenção podem 30 incluir uma emulsão dupla de água em água e óleo em água. Dentro do escopo da presente invenção, uma composição de micropartículas compreendendo uma fase aquosa interna compreendendo glatirâmero ou qualquer sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, uma fase óleo ou fase imiscível em água

compreendendo um polímero biodegradável ou não-biodegradável e uma fase aquosa externa. A fase aquosa externa pode incluir mais um surfactante, preferencialmente álcool polivinílico (PVA), polissorbato, ésteres de celulose ou copolímeros de bloco de óxido de polipropileno de óxido de polietileno . Os termos 5 "fase de óleo" e "fase imiscível em água" podem ser usados permutavelmente aqui.

A presente invenção ainda fornece um método de tratamento da esclerose múltipla pela administração parenteral de uma composição farmacêutica de ação prolongada compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de acetato 10 de glatirâmero ou qualquer outro sal farmaceuticamente aceitável de glatirâmero para um indivíduo com necessidade de acetato de glatirâmero. Dentro do escopo da presente invenção, é um método de tratamento de esclerose múltipla pela administração em um indivíduo com necessidade de acetato de glatirâmero ou qualquer outro sal farmaceuticamente aceitável de glatirâmero em forma de 15 *depot*. O termo "tratamento", tal como usado aqui, refere-se a supressão ou redução dos sintomas após o início da esclerose múltipla. Sintomas comuns após o aparecimento da esclerose múltipla incluem, mas não limitando-se a eles, redução ou perda da visão, marcha irregular e tropeço, fala arrastada, bem como frequência urinária e incontinência. Além disso, a esclerose múltipla pode causar 20 alterações de humor e depressão, espasmos musculares e paralisia severa. O "indivíduo" para o qual a droga é administrada é um mamífero, de preferência, mas não limitado a, um ser humano. O termo "esclerose múltipla", tal como usado neste documento, refere-se a uma doença autoimune do sistema nervoso central que é acompanhada de um ou mais dos sintomas descritos acima.

25 O termo "glatirâmero acetato", tal como usado aqui, refere-se a um composto conhecido como copolímero 1 que é vendido sob o nome comercial Copaxone® e consiste de sais de acetato de polipeptídeos sintéticos, que contêm quatro aminoácidos que ocorrem naturalmente: ácido L-glutâmico, L-alanina, L-tirosina e L-lisina com uma fração molar média de 0,141, 0,427, 0,095 e 0,338, 30 respectivamente. O peso molecular médio de acetato de glatirâmero em Copaxone® é 4,700-11.000 daltons (rótulo da FDA Copaxone®) e o número de aminoácidos varia entre cerca de 15 a aproximadamente 100 aminoácidos. O termo também se refere a derivados químicos e análogos do composto.

Normalmente, o composto é preparado e caracterizado como especificado em qualquer uma das Patentes U.S. nº 5.981.589; 6.054.430; 6.342.476; 6.362.161; 6.620.847; e 6.939.539, o conteúdo de cada uma dessas referências é incorporado em sua totalidade por meio deste documento.

5        Em algumas modalidades, a composição pode incluir qualquer outro sal farmaceuticamente aceitável de glatirâmero incluindo, mas não limitado a, sulfato, piro sulfato, bissulfato, sulfito, bissulfito, fosfato, monohidrogenfosfato, dibidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloridrato, hidrobromida, iodidrato, acetato, nitrato, propionato, decanoato, caprilato de, acrilato, Formiato, isobutirato, 10      caprato, heptanoato de propiolato, oxalato, malonato, succinato, tocoferol, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexine-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metóxibenzoato, ftalato, tereftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, 15      fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato,  $\beta$ -hidroxibutirato, glicolato, tartarato, metanosulfonato, propanesulfonato, naftaleno-2-sulfonato, p-toluenesulfonato, mandelato e os sais similares. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção.

Os copolímeros podem ser feitos por qualquer procedimento disponível a uma pessoa versada na técnica. Por exemplo, os copolímeros podem ser feitos 20      em condições de condensação utilizando a desejada relação molar de aminoácidos em solução, ou por processos sintéticos de fase sólida. Condições de condensação incluem a temperatura adequada, pH e condições de solventes para condensar o grupo carboxila de um aminoácido com o grupo amino de outro aminoácido para formar uma ligação peptídica. Agentes de condensação, por 25      exemplo, diciclohexilcarbodiimida, podem ser usados para facilitar a formação da ligação peptídica.

Grupos bloqueadores podem ser usados para proteger os grupos funcionais, como as metades de cadeia lateral e alguns dos grupos amino ou carboxila contra reações colaterais indesejáveis. O processo divulgado na 30      Patente U.S. nº 3.849.550, o conteúdo da qual é incorporado neste documento por referência em sua totalidade, pode ser usado para preparar os copolímeros da invenção. Por exemplo, os N-carboxianidridos de tirosina, alanina, glutamato  $\gamma$ -benzílico e N,  $\epsilon$ -trifluoroacetil-lisina são polimerizados em temperaturas ambiente

em dioxano anidro com dietilamina como um iniciador. O grupo de  $\gamma$ -carboxila do ácido glutâmico pode ser desbloqueado por bromida de hidrogênio em ácido acético glacial. Os grupos de trifluoroacetil são retirados da lisina por uma piperidina molar. Uma pessoa versada na técnica prontamente entende que o 5 processo pode ser ajustado para fazer peptídeos e polipeptídeos contendo os aminoácidos desejados, ou seja, três dos quatro aminoácidos em copolímero 1, eliminando seletivamente as reações que se relacionam com qualquer um de ácido glutâmico, alanina, tirosina ou lisina. Patente U.S. nº 6.620.847; 6.362.161; 10 6.342.476; 6.054.430; 6.048.898 e 5.981.589, o conteúdo das quais é incorporado, neste documento, por referência na sua totalidade, divulga os melhores métodos para a preparação do acetato de glatirâmero (Cop-1). Para esta aplicação, os termos “temperatura ambiente” e “temperatura ambiente” geralmente significam uma temperatura variando de cerca de 20 °C até cerca de 26 °C.

O peso molecular dos copolímeros pode ser ajustado durante a síntese do 15 polipeptídeo ou depois que os polímeros foram feitos. Para ajustar o peso molecular durante a síntese do polipeptídeo, as condições sintéticas ou as quantidades de aminoácidos são ajustadas para que a síntese do polipeptídeo atinja o comprimento aproximado desejado. Após a síntese, os polipeptídeos com 20 peso molecular desejado podem ser obtidos por qualquer processo de seleção do tamanho disponível, como cromatografia de polipeptídeos em uma coluna de dimensionamento do peso molecular ou gel e coleção dos intervalos de peso molecular desejado. Os polipeptídeos presentes também podem ser parcialmente hidrolisados para remoção de espécies de alto peso molecular, por exemplo, por hidrólise ácida ou enzimática, e então purificados para remover o ácido ou as 25 enzimas.

Em uma modalidade, os copolímeros com um peso molecular desejado podem ser preparados por um processo que inclui reagir um polipeptídeo protegido com ácido hidrobrônico para formar um trifluoroacetil-polipeptídeo tendo o perfil de peso molecular desejado. A reação é executada por um tempo e 30 a uma temperatura que é predeterminada por uma ou mais reações de teste. Durante a reação de teste, o tempo e a temperatura são variadas e o intervalo de peso molecular de um determinado lote de polipeptídeos de teste é determinado. As condições de teste que fornecem o intervalo de peso molecular ideal para esse

lote de polipeptídeos são usadas para o lote. Assim, um polipeptídeo-trifluoroacetil, tendo o perfil de peso molecular desejado, pode ser produzido por um processo que inclui reagir o polipeptídeo protegido com ácido de hidrobrômico por um tempo e a uma temperatura pré-determinada pela reação de teste. O 5 trifluoroacetil-polipeptídeo com o perfil de peso molecular desejado é então tratado com uma solução aquosa de piperidina para formar um polipeptídeo desprotegido tendo o peso molecular desejado.

Em umamodalidade preferencial, uma amostra de polipeptídeo protegido a partir de um determinado lote é reagida com ácido hidrobrômico por cerca de 10-10 50 horas, a uma temperatura de cerca 20-28°C. As melhores condições para esse lote são determinadas ao se executarvárias reações de teste. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo protegido é reagido com ácido hidrobrômico por cerca de 17 horas, a uma temperatura de cerca de 26°C.

Em determinadas modalidades, as formas de dosagem incluem, mas não 15 estão limitadas a, sistemas biodegradáveis *depot* injetável, tais como, sistemas *depot* injetáveis baseados em PLGA; sistemas *depot* injetáveis baseados em não-PLGA, e géis ou dispersões biodegradável injetável. Cada possibilidade representa uma modalidadese separada da invenção. O termo "biodegradável", tal 20 como utilizado neste documento, refere-se a um componente que corrói ou que se degrada em suas superfícies ao longo do tempo, devido, pelo menos em parte, ao contato com substâncias encontradas nos fluidos do tecido circundante, ou por ação celular. Em particular, componente biodegradável é um polímero tal como, mas não limitado a, polímeros baseados em em ácido láctico, tais como polilactídeos, por exemplo, poli (D, L-lactídeo), ou seja, PLA; polímeros baseados 25 em ácido glicólico, tais como poliglicolídos (PGA), por exemplo, Lactel®, da Durect; poli (D, L-lactídeo-co-glicolído), ou seja, PLGA, (Resomer® RG-504, Resomer® RG-502, Resomer® RG-504H, Resomer® RG - 502H, Resomer® RG-504S, RG-502S Resomer®, da Boehringer, Lactel®, da Durect); policaprolactonas, tais como poli(e-caprolactona), ou seja, PCL (Lactel® da 30 Durect); polianidridos; poli(ácido sebácico) SA; poli(ácido ricenólico) RA; poli(ácido fumárico), FA; poli(ácido graxo dímero), FAD; poli(ácido tereftálico), TA; poli(ácido isoftálico), IPA; poli(p-{carboxifenoxy}metano), CPM; poli(p-{carboxifenoxy} propano), CPP; poli(p-{carboxifenoxy}hexano)s CPH; poliaminas,

- poliuretanos, poliesteramidas, poliortoésteres {CHDM: cis/trans-ciclohexil dimetanol, HD:I,6-hexanodiol. DETOU: (3,9-dietilideno-2,4,8,10-tetraoxaspiro undecano)}; polidioxanonas; polihidroxibutiratos; oxalatos de polialquíleno; poliamidas; poliesteramidas; poliuretanos; poliacetais; policetais; policarbonatos; 5 poliortocarbonatos; polisiloxanos; polifosfazenos; succinatos; ácido hialurônico; poli(ácido málico); poli(aminoácidos); polihidroxivaleratos; polialquíleno succinatos; polivinilpirrolidona; poliestireno; ésteres de celulose sintética; ácidos de poliacrílico; ácido polibutírico; copolímeros tribloco (PLGA-PEG-PLGA), copolímeros tribloco (PEG--PLGA-PEG), poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), 10 poli (óxido de etileno)- poli (óxido de propileno)- poli (óxido de etileno) copolímeros tribloco (PEO-PPO-PEO), poli ácido valérico; glicol de polietileno; polihidroxialquilcelulose; quitina; quitosana; poliortoésteres e copolímeros, terpolímeros; lipídios, tais como colesterol, lecitina; poli(ácido glutâmico-co-etyl glutamato) e assim por diante, ou misturas dos mesmos.
- 15 Em algumas modalidades, as composições da presente invenção compreendem um polímero biodegradável selecionado a partir de, mas não limitado a, PLGA, PLA, PGA, policaprolactona, polihidroxibutirato, poliortoésteres, polialquaneanidridos, gelatina, colágeno, celulose oxidada, polifosfazeno e afins. Cada possibilidade representa uma modalidade separada.
- 20 Polímero biodegradável preferencial atualmente é um polímero baseado em ácido láctico, mais preferencialmente, polilactídeo ou poli (D, L-lactídeo-co-glicólido), ou seja, PLGA. Preferencialmente, o polímero biodegradável está presente em quantidade entre cerca de 10% a cerca de 98% p/p da composição. O polímero baseado em ácido láctico tem uma proporção de monômero de ácido 25 láctico a ácido glicólico no intervalo de 100:0 a cerca de 0:100, preferencialmente de 100:0 a de cerca de 10:90 e tem um peso molecular médio de cerca de 1.000 a 200.000 daltons. No entanto, entende-se que a quantidade de polímero biodegradável é determinada por parâmetros tais como a duração do uso e afins.
- 30 As composições da presente invenção podem compreender, adicionalmente, um ou mais excipiente(s) farmaceuticamente aceitável selecionado a partir de, mas não limitado a, co-surfactantes, solventes/co-solventes, solventes imiscíveis em água, água, solventes miscíveis em água, componentes oleosos, solventes hidrofílicos, emulsificantes, conservantes,

antioxidantes, antiespumantes, estabilizadores, agentes tamponantes, agentes de regulação do pH, agentes osmóticos, agentes de formação de canal, agentes de ajustamento osmótico ou qualquer outro excipiente conhecido na técnica. Co-surfactantes adequados incluem, mas não estão limitados a, polietileno glicóis, 5 copolímeros de bloco de polioxietileno-polioxipropileno conhecidos como “poloxâmero”, ésteres de ácido graxo, tais como monolaurato de poliglicerina e monomiristato decagliceril, , éster de ácido graxo de sorbitano, tal como monoestearato de sorbitano, éster de ácido graxo de sorbitano de polioxietileno, tal como monooleato de sorbitano de polioxietileno (Tween), éster de ácido graxo 10 de glicol de polietileno, tal como monoestearato de polioxietileno, éter de alquil polioxietileno, tal como I éter de lauril de polioxietileno, óleo de rícino polioxietileno e óleo de rícino endurecido, tal como polioxietileno endurecido, óleo de rícino e afins ou misturas dos mesmos. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção. Solventes, co-solventes adequados incluem, 15 mas não limitados a, álcoois, triacetina, dimetil isosorbida, glicofurol, carbonato de propileno, água, dimetil acetamida e afins ou misturas dos mesmos. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção. Agentes anti-espuma adequados incluem, mas não estão limitados a, emulsões de silicone ou sesquioleato de sorbitano. Estabilizadores adequados para evitar ou reduzir a 20 deterioração dos componentes nas composições da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, antioxidantes, como a glicina,  $\alpha$ -tocoferol ou ácido ascórbico, BHA, BHT e afins ou misturas dos mesmos. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção. Modificadores de tonicidade adequados incluem, mas não estão limitados a, manitol, cloreto de sódio e 25 glicose. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção. Agentes tamponantes adequados incluem, mas não estão limitados a, acetatos, fosfatos e citratos com cátions adequados. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção.

As composições da presente invenção podem ser preparadas por qualquer 30 forma conhecida na técnica. Atualmente preferencial é a incorporação do glatirâmero ou do sal do mesmo copolímero em um sistema de entrega coloidal, por exemplo, micropartículas biodegradáveis, permitindo assim o retardo de liberação por difusão através das paredes de polimérico da partícula e pela

degradação do polímero em meio aquoso ou fluidos biológicos no corpo. As composições da presente invenção podem ser preparadas na forma de micropartículas injetáveis por um processo conhecido como a "emulsificação dupla ". Brevemente, a solução concentrada do copolímero hidrossolúvel é 5 disperso em uma solução do polímero biodegradável ou não-biodegradável em solvente orgânico volátil imiscível em água (por exemplo, cloreto de metileno, clorofórmio e afins). A assim obtida emulsão "água em óleo" (w/o) é então dispersa em uma fase aquosa externa contínua contendo surfactante (por exemplo, álcool de polivinil - PVA, polisorbatos, copolímeros em bloco de óxido de 10 polipropileno-óxido de polietileno, ésteres de celulose e afins) para formar gotículas de "emulsão dupla de água em água e óleo em água (w/o/w)". Após evaporação do solvente orgânico, as micropartículas solidificam e são recolhidas 15 por filtração ou centrifugação. As micropartículas coletadas (MPs) são lavadas com água purificada para eliminar a maioria do surfactante e do peptídeo não-ligado e são centrifugadas novamente. Os MPs lavados são coletados e lyophilizados sem aditivos ou com a adição de crioprotetor (manitol) para facilitar a sua reconstituição posterior.

O tamanho de partícula da "emulsão dupla de água em água e óleo em água (w/o/w) pode ser determinado por diversos parâmetros, incluindo, mas não 20 limitado a, a quantidade de força aplicada a esta faseo, a velocidade de mistura, concentração e tipo de surfactante, etc. Variação de tamanhos de partícula adequada de cerca de 1 a 100  $\mu\text{m}$ .

Os sistemas *depot* da presente invenção abrangem todas as formas conhecidas para uma pessoa versada na técnica. Formas adequadas incluem, 25 mas não estão limitadas a, microesferas biodegradáveis ou não, hastes implantáveis, cápsulas implantáveis e anéis implantáveis. Cada possibilidade representa uma modalidadese separada da invenção. Adicionalmente contempladas são *depot* de gel de liberação prolongada e matrizes erodíveis. Cada possibilidade representa uma modalidadese separada da invenção. Sistemas 30 implantáveis adequados são descritos, por exemplo, em US 2008/0063687, cujo conteúdo é incorporado pelo presente documento em sua totalidade. Hastes implantáveis podem ser preparadas, como é conhecido na técnica, usando-se

micro-extrusoras adequados, tais como as descritas, por exemplo, em <http://www.randcastle.com/prodinfo.html>.

De acordo com os princípios da presente invenção, as composições farmacêuticas de ação prolongada da presente invenção fornecem igual ou maior eficácia terapêutica para as formas de dosagem injetável diária disponíveis comercialmente, com menor incidência de efeitos colaterais e com reduzida gravidade dos efeitos colaterais a nível sistêmico e/ou local. Em algumas modalidades, as composições da presente invenção fornecem liberação prolongada ou ação prolongada de glatirâmero em um indivíduo em relação a uma dose similar de uma formulação de liberação imediata de acetato de glatirâmero.

É abrangida pela presente invenção uma terapia de combinação de acetato de glatirâmero ou qualquer outro sal farmaceuticamente aceitável de glatirâmero com pelo menos um outro agente ativo. Agentes ativos dentro do escopo da presente invenção incluem, mas não estão limitados aos interferons, por exemplo,  $\alpha$ -interferons peguilado ou  $\alpha$ -interferons não peguilado ou  $\beta$ -interferons, por exemplo, o interferon  $\beta$ -1a ou interferon  $\beta$ -1b ou  $\tau$ -interferons; Imunossupressão opcionalmente antiproliferativo/antineoplástico atividade, por exemplo, mitoxantrona, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida ou esteróides, por exemplo, 20 metilprednisolona, prednisona ou dexametasona ou agentes secretoras de esteróides, por exemplo, ACTH; inibidores de adenosina deaminase, por exemplo, cladribina; Imunoglobulina IV G (por exemplo, divulgada em Neurology, 1998, May 50(5):1273-81) anticorpos monoclonais para vários marcadores de superfície 25 células T, por exemplo, o natalizumab (ANTEGREN®) ou alemtuzumab; Th2 citocinas promovendo, por exemplo, a IL-4, IL-10, ou compostos que inibem a expressão de TH1 promoção citocinas, por exemplo, inibidores da fosfodiesterase, por exemplo, pentoxifilina; agentes relaxantes, incluindo baclofen, diazepam, piracetam, dantroleno, lamotrigina, Artigos de casa de rifuzol, tizanidina, Clonidina, betabloqueadores, ciproheptadina, orfenadrina ou 30 canabinóides; Antagonistas do receptor AMPA glutamato, por exemplo, 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo (f) quinoxalina, 1, 2,3,4-tetrahidro-7-morfolin-il-2,3-dioxo-6-(trifluorometil) quinoxalin-i-ilmetilfosfonato, 1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metileno-dioxi-5 H-2,3-benzodiazepínicos ou (-) 1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-

metíleno-dioxi-4,5-dihidro-3-metilcarbamoil-2,3-benzodiazepina; inibidores de VCAM-1 expressão ou antagonistas de seu ligante, por exemplo, antagonistas das integrinas de integrinas VLA-4 e/ou  $\alpha$ -4- $\beta$ -7 de  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, por exemplo, o natalizumab (ANTEGREN®); fator inibitório de migração anti-macrófago (Anti-5 MIF); XII) inibidores de catepsina S; XIII) inibidores de mTor. Cada possibilidade representa uma personificação separada da invenção. Atualmente, preferiu um outro agente ativo é FTY720 (2-amino-2-2-(4-octilfenil)etil propano-1, 3-diol; fingolimod) pertencentes à classe de Imunossupressão.

Os exemplos a seguir são apresentados em ordem para mais plenamente 10 ilustrar determinadas modalidades da invenção. Eles devem em nenhuma maneira, no entanto, ser interpretados como limitando o alcance da invenção. Um hábil na técnica pode facilmente elaborar muitas variações e modificações dos princípios divulgados neste documento sem se afastar do âmbito da invenção.

### **Exemplos**

15 **Exemplo 1: Métodos de preparação geral**

Partículas depot injetáveis baseadas em PLGAMicropartículas foram preparadas pelo método de extração/evaporação de solvente (emulsão única). Uma solução de 50:50, diclorometano/etanol contendo 250 mg de PLGA e 200 mg de acetato de glatirâmero foi lentamente derramada em (200 ml) de solução 20 aquosa contendo 2% PVA e emulsionada com um agitador mecânico (300 rpm) a 25°C. O solvente orgânico foi evaporado sob agitação (100 rpm) por 2h. As micropartículas assim formadas foram coletadas por centrifugação e lavadas com água destilada para remover excesso emulsificante. A suspensão final foi então liofilizada para obter um pó fino.

25 Partículas depot injetáveis baseadas em PolicaprolactonaMicropartículas foram preparadas pelo método de extração/evaporação de solvente (emulsão única). Uma solução de 70:30, diclorometano/acetona contendo 500 mg de policaprolactona e 200 mg de acetato de glatirâmero foi lentamente derramada em uma solução aquosa (200 ml) contendo 2% PVA, 1% Tween 80 e 30 emulsionada usando agitador mecânico (500 rpm) a 25°C. O solvente orgânico foi evaporado sob agitação (300 rpm) por 4 h. As micropartículas formadas foram coletadas por centrifugação e lavadas com água destilada para remover excesso

de emulsionantes. A suspensão final foi então congelada a seco para obter um pó fino.

#### Hastes-implantes baseados em PLGA

Implantes em forma de haste biodegradáveis baseados em PLGA, 20 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro, foram preparados pelo método de extração/evaporação de solvente. Uma solução de 50:50, diclorometano/etanol contendo 250 mg de PLGA e 200 mg de acetato de glatirâmero foi lentamente derramada em um molde em forma de haste especial. O solvente orgânico foi evaporado em estufa de vácuo durante 12hrs à temperatura ambiente. Alternativamente, o implante em forma de haste foi preparado por extrusão da mistura de 250 mg de PLGA e 200 mg de glatirâmero a 85-90°C, usando uma extrusora semelhante a um parafuso (Microtruder Rancastle RCP-0250 ou similar), com diâmetro de 0,8 ou 1,0 mm.

#### Exemplo 2: Método analítico – ensaio de acetato de glatirâmero

##### 15 Equipamentos

Espectrofotômetro

Balança analítica, capacidade de pesagem com precisão a 0.01 mg

##### Materiais e reagentes

Acetato de glatirâmero 83% como um padrão de referência

ácido 2,4, 6-trinitrobenzenesulfônico(TNBS, , ácido picrilsulfônico, 170.5 mM) 5% em MeOH

0.1 M de tampão borato pH 9,3 (decahidrato de tetraborato de sódio MW 381.37)

água purificada

25 pipetas volumétricas de 0,5, 1,0, 2,0 e 7,0 mL

diversos artigos de vidro.

##### Preparações

###### Preparação da solução de estoque de glatirâmero 400 µg/mL

4.8 mg de acetato de glatirâmero (potência 83 como base para o padrão de referência), foram pesados em um balão volumétrico de 10 ml. Cerca de 7 ml de tampão de borato de 0.1 m foram adicionados para proporcionar dissolução do acetato de glatirâmero em banho ultrassônico. A solução foi adicionalmente diluída

com tampão de borato de 0.1 M para obter a solução estoque de glatirâmero 400 µg/ml (como base).

Preparação de 0,25% da solução de trabalho de TNBS

Antes do uso, 5% do estoque de solução de TNBS foi diluído com água 5 (20 vezes; por exemplo, 50 µl e 950 µl de água) para obter 0,25% da solução de trabalho de TNBS..

Preparação de padrões de curva de calibração

Oito soluções padrão de calibração de glatirâmero (cSTD; 4 ml cada) foram preparadas de acordo com a tabela 1.

10 Tabela 1. Soluções-padrão de acetato de glatirâmero

cSTD #	Concentração de glatirâmero µg/ml (como base)	Volume de glatirâmero solução (ml)	Volume de glatirâmero Std 3 (ml)	Volume de 0.1M Tampão de borato (ml)
Std 0	0		-	4
Std 1	2		0.4	3.6
Std 2	10		2	2
Std 3	20	0.2		3.8
Std 4	50	0.5		3.5
Std 5	100	1		3
Std 6	200	2		2
Std 7	400	4		-

Medição da densidade óptica

1,0 ml de cada solução padrão de calibração do glatirâmero, amostras (duplicad) e reagent branco(0.1M tampão de borato) foram transferidos para o tubo de centrífuga de polipropileno de 1,5 ml, para os quais 50 µl de 0.25% de 15 solução de trabalho de TNBS foram adicionados. A solução foi completamente misturada e mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. As densidades ópticas de cada uma das soluções obtidas foram lidas em 420nm e 700nm e as diferenças dessas densidades foram calculadas para evitar o erro devido à dispersão de luz em sistemas coloidais. Calculou-se uma curva de calibração 20 para o intervalo selecionado de concentrações.

Critérios de aceitação

A diferença entre resultados para preparações de amostra duplicada foi de 5% de NMT, calculada pela seguinte equação:

$$D = \frac{(Rsp11 - Rsp12) \times 2}{Rsp11 + Rsp12} \times 100,$$

em que  $Rspl1$  é o resultado obtido para a amostra 1 e  $Rspl2$  é o resultado obtido para a amostra 2.

Exemplo 3: Preparação de micropartículas PLGA carregadas com acetato de glatirâmero

5 Fase aquosa (contínua) externa: 30 ml de solução de 0,75% de NaCl em água purificada, contendo, adicionalmente, 0,5% de álcool polivinílico parcialmente hidrolisado (87-89%) (PVA) como um surfactante, 0,2% de polisorbato-80 (Tween-80) para MPG-10 e 2% de PVA para preparação de MP em branco.

10 Fase aquosa interna (para a solução de peptídeo): 150-200  $\mu$ l de água filtrada por 25-30 mg de acetato de glatirâmero. O acetato de glatirâmero foi dissolvido em água com um banho de ultrassom.

15 Solução polimérica orgânica (fase de óleo): 165-300 mg de PLGA em 2-5 mL de cloreto de metíleno. Opcionalmente, um contra-íon foi adicionalmente dissolvido ou disperso na fase orgânica.

Processo de preparação

20 Preparação de emulsão água em óleo (w/o): fase aquosa interna, contendo acetato de glatirâmero dissolvido, foi misturada diretamente no tubo de ensaio com a fase de óleo contendo solução de PLGA em  $CH_2Cl_2$ . A mistura foi completamente agitada e tratada com penetrador ultrassônico (tipo titânio, potência máx. 120 watts, potência de trabalho 10-15%, 3-5 ciclos de 5 segundos). Resfriamento foi opcionalmente aplicado, utilizando-se gelo ou água gelada para evitar a ebulição do cloreto de metíleno.

25 Preparação (w/o/w) de emulsão dupla: A emulsão w/o assim obtida da solução de acetato de glatirâmero em solução polimérica orgânica de PLGA foi adicionalmente tratada com misturador de alto cisalhamento (misturador pequeno, VDI-12, diâmetro do eixo, 10 mm, e misturador maior, OMNI-1100, diâmetro do eixo, 18 mm) a várias velocidades por 30-120 segundos.

30 Eliminação de solvente: um copo aberto com a assim formada dupla emulsão foi colocado sobre a chapa do agitador magnético e foi agitado por 3-4 horas em temperatura ambiente em uma coifa, até que todo o cloreto de metíleno evaporasse e as micropartículas se solidificassem.

Centrifugação de micropartículas: a suspensão de micropartículas solidificadas foi centrifugada a 2000-5000g por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um recipiente separado e analisado para o conteúdo de acetato de glatirâmero a fim de calcular a incorporação e a ligação de peptídeo.

5 Lavagem de micropartículas: as micropartículas sedimentadas a partir do procedimento descrito acima foram suspensas em 10 ml de água purificada usando vórtice e um banho ultrassônico e agitadasou sonicadopor 2-3 minutos. A suspensão das micropartículas foi centrifugada novamente em 2000 – 5000g por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um recipiente separado e 10 analisado por conteúdo de acetato de glatirâmero.

15 Liofilização: O precipitado lavado de micropartículas foi re-suspendido em 3-5 ml de água purificada ou 5% de manitol , transferido para frascos de vidro de 10 ml previamente pesados, congelados usando conjunto de placa de liofilizador a - 37—43°C e liofilizado (principal secagem por 16-48 horas a -20°C e - vácuo 0,05 bar, secagem final por 12 a 16 horas a +20°C e 0,025 bar). Frascos após liofilização foram pesados, fechados com rolhas de borracha de bromobutil e armazenados em condições de armazenamento frigorífico até o uso.

20 Estimativa de tamanho de partícula: tamanho de partícula das micropartículas foi avaliado usando campo de luz e fase de microscopia de contraste (Leutz Ortoplan™, Alemanha) com objetivos 40 x e x 10 e micrômetro de estágiocom intervalo de 1-1000 µm.

25 Todas as formulações de micropartículas foram preparadas utilizando-se água contendo 0,75% de cloreto de sódio para aumentar a pressão osmótica externa e melhorar a incorporação da droga carregada solúvel em água. Micropartículas (primeiro experimento) em branco (vazias) foram obtidas com 2% PVA como tensoativo, considerando que, para a preparação de todas as formulações carregadas com peptídeos, 0,5% de PVA foi usado.

30 Parâmetros do processo de preparação e composições são apresentados nas tabelas 2-5.

Tabela 2. Micropartículas PLGA para liberação sustentada de acetato de glatirâmero (GA) (formulações 1-4)

	MP Branco	MPG-01	MPG-02	MPG-03	MPG-04
<b>Fase aquosa</b>					

<b>interna</b>					
GA, mg		17	60.25	30	18.7
GA base seca, mg	0	14.11	50.0	24.9	15.5
Água para GA, $\mu$ l		100	400	200	100+50 $\mu$ l de 2% PVA
<b>Polímero na fase óleo</b>					
PLGA RG 502H, mg	215	270			165
PLGA RG 502, mg			500	220	
<b>Fase óleo</b>					
Succinato de tocoferol		100	120	50	65
Cloreto de metileno	2ml (2.3g)	4.5 g	9 g	3.2 g	3 g
<b>Fase aquosa externa</b>					
PVA (2% ou 0.5%)	23 ml 2%	65 ml 0.5%	60 ml 0.5%	30 ml 0.5%	30 ml 0.5%
NaCl	0	0.5 g	0.5 g	0.25 g	0.25 g
Descrição do processo de preparação (processador, conjunto de velocidade, duração da evaporação )	IKA VDI-12 #5 30 seg., evap. TA durante a noite agitador magnético	IKA VDI-12 #5 2 min, evap. TA durante a noite agitador magnético	IKA VDI-12 #5 2 min, evap. TA durante a noite agitador magnético	IKA VDI-12 #5 2 min, evap. 4 hr Agitador magnético	IKA VDI-12 #5 2 min, evap. 4hr Agitador magnético
Descrição de micropartículas	MP esférico 10-50 $\mu$ m superfície lisa	MP esférico 5-20 $\mu$ m superfície porosa	agregado MP 10-30 $\mu$ m superfície porosa	MP esférico 10-15 $\mu$ m superfície levemente porosa	MP esférico 10-15 $\mu$ m superfície levemente porosa
Ligação (associação com MPs)		86%	34%	61%	70%

Misturador de alto cisalhamento VWR VDI-12 da IKA Alemanha, com pequeno diâmetro do estator (eixo de 12 mm) e intervalo de velocidade 8-30.000 rpm foi definido na posição #5 (cerca de 24.000 rpm). Tratamento curto (30 seg.) de aprox. 10% de solução de PLGA de cloreto de metileno em 2% da fase de 5 PVA foi usada para preparar a amostra de MP em branco, a qual resultou em suaves micropartículas esféricas com distribuição de tamanho relativamente

grande (10-50  $\mu\text{m}$ ). Devido à formação de espuma, novo processo foi realizado em baixa concentração de surfactante. Tempo de homogeneização também foi estendido (tratamento de 1 ou 2 minutos) para obter uma distribuição de tamanho mais estreita.

5 Devido à presença da fase interna de água na emulsão dupla, todas as micropartículas preparadas com o peptídeo de glatirâmero tinham inclusões visíveis e sinais de porosidade na superfície de MP ou no interior da partícula, quando observadas ao microscópio óptico.

10 Tabela 3. Micropartículas PLGA para liberação sustentada de acetato de glatirâmero (GA) (formulações 5-7)

	MPG-05	MPG-06	MPG-07
<b>Fase aquosa interna</b>			
GA, mg	30.8	20	20
GA base seca, mg	25.6	16.6	16.6
Água para GA, $\mu\text{l}$	100+50 PVA 2%	166	175
<b>Polímero na fase óleo</b>			
PLGA RG 502H, mg	165		
PLGA RG 502, mg		200	250
<b>Fase óleo</b>			
Dicetilfosfato		75	
Sódio de dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG Na)			60
Cloreto de metileno	2.7 g	2.5 g	3.25 g
<b>Fase aquosa externa</b>			
PVA (0.5%)	30 ml	30 ml	30 ml
NaCl	0.25 g	0.25 g	0.25 g
Observações e comentários		Flocos formaram a partir de DCP e GA	DMPG Na é pouco solúvel em $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
Descrição do processo de preparação (processador, conjunto de velocidade, duração de evaporação)	IKA VDI-12 #5 2 min, agitador de constituintes de 4 hr RT de evaporação	IKA VDI-12 #5 2 min, evaporação 4hr Agitador magnético	IKA VDI-12 #5 2 min, evaporação 4hr RT agitador magnético
Descrição de micropartículas	MP esférico 10-15 $\mu\text{m}$	partículas irregulares	MP esférico 5-15 $\mu\text{m}$

	superfície levemente porosa		
Ligação (associação com MPs)	81%	76%	84%

As micropartículas carregadas com acetato de glatirâmero formado foram centrifugadas; a pastilha foi ressuspensa em água purificada, lavada e centrifugada repetidamente. Sobrenadante e, em alguns casos, água de lavagem foram analisados para o conteúdo de acetato de glatirâmero. O precipitado centrifugado foi ressuspendido em água filtrada ou 5% de solução de manitol e lyophilizado.

Tabela 4: Micropartículas PLGA para liberação sustentada de acetato de glatirâmero (GA) (formulações 05R, 08-011 e sal de succinato de tocoferol de glatirâmero)

	MPG-08	MPG-09	MPG-10	MPG-11	MPG-05R	Sal de succinato de tocoferol 1:1
<b>Fase aquosainte rna</b>						
GA, mg	30.1	30.1	30.1	30.1	30.9	30.1
GA base seca, mg	25.0	25.0	25.0	25.0	25.6	25.0
Água, µl	150	200	200	200	200	200
<b>Polímero</b>						
PLGA RG 502H, mg	165	165			165	
PLGA RG-503, mg			165	165		0
<b>Fase óleo</b>						
Tocoferil succinato, mg	20	50	20	50	0	10
Cloreto de metileno	2.7 g	2.7 g	2.7 g	3.2 g	3.7 g	2 g
<b>Fase aquosa externa</b>						
Surfactante	30 ml 0.5% PVA	30 ml 0.5% PVA	30 ml 0.2% Tw80	30 ml 0.5% PVA	30 ml 0.5% PVA	20 ml H <sub>2</sub> O

NaCl	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25g	—
Descrição do processo de preparação (processador, conjunto de velocidade, duração de evaporação )	OMNI GLH #4 1 min, evap. 4hr RT ag. magnético	OMNI GLH #4 1 min, evap. 4hr RT ag. magnético	OMNI GLH #4 1 min, evap.4hr RT ag. magnético	OMNI GLH #4 1 min, evap.4hr RT ag. magnético	IKA VDI-12 #5 2 min, evap.4hr RT ag. magnético	22 kHz Sonicação do penetrador de titânio 13W 60 seg.
Descrição de micropartículas	Esférico MP 2-5 µm suave	Esférico MP 1-3 µm suave	MP esférico 3-5&20 µm suave	Esférico MP 2-4 µm suave	MP esférico 1-10 µm com inclusões	Aglomerado esférico 30-100 µm
Ligaçāo (Associação com MPs)	82%	87%	46%	85%	93%	89%

Formulação de um complexo equimolar (sal) de succinato tocoferil (530

MW, um COOH eq. 265 Dalton) e acetato de glatirâmero (MW 4.700-11.000, um NH<sub>2</sub> eq. ~ 693 Dalton) foi preparada por suspensão de solução aquosa de glatirâmero em cloreto de metileno com quantidade equimolar previamente

5 dissolvida de succinato de tocoferil com a ajuda de um penetrador ultrassônico durante 60 segundos (6x10sec) com gelo de refrigeração. Após a evaporação do solvente orgânico e da água, o produto insolúvel aquoso assim formado foi coletado, lavado com água purificada e com etanol seco e usado para novas investigações sem purificação adicional.

10 Tabela 5. Micropartículas PLGA para liberação sustentada de acetato de glatirâmero (GA) (formulações MPG-12 – 15)

	MPG-12	MPG-13	MPG-14	MPG-15
<b>Fase aquosa interna</b>				
GA, mg	31.8	31.8	31.5	31.7
GA base seca, mg	26.4	26.4	26.1	26.3
Água, µl	200	200	200	200
<b>Polímero na fase óleo</b>				

PLGA RG 502H, mg	200	250	300	165
<b>Fase óleo</b>				
Succinato de tocoferil, mg				9
Cloreto de metileno	2.6 g	2.7 g	2.7 g	2.6 g
<b>Fase aquosa externa</b>				
0.5% de solução de PVA	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml
NaCl	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g
Descrição do processo de preparação (processador, conjunto de velocidade, duração de evaporação)	IKA VDI-12 #5 (1 min), evaporação 4hr Agitador magnético RT	IKA VDI-12 #5 (1 min), evaporação 4hr Agitador magnético RT	IKA VDI-12 #5 (1 min), evaporação 4hr Agitador magnético RT	IKA VDI-12 #6 20sec, #5 40sec, evaporação 4hr Agitador magnético
Descrição de micropartículas	partículas esféricas 10-15 µm com inclusões	partículas esféricas 10-18 µm com inclusões	partículas esféricas 10-15 µm com inclusões	partículas esféricas 6-10 µm com inclusões; agregados
Ligação (associação com MPs)	85.4%	94.9%	96.4%	70.9%
Explosão (liberação em 1 hora)	18.9%	8.5%	9.5%	13.6%
Quantidade de GA, liberado entre o dia 4 e dia 11	25.6%	21.0%	32.7%	19.6%

#### Liofilização

5 Formulações de micropartículas após centrifugação e lavagem foram liofilizadas ou "como é", re-suspensão de sedimento a seguir em água purificada, ou, em alguns casos, com a adição de crioprotetor (sedimento foi ressuspendido em uma solução de 5% de manitol). Amostras foram congeladas durante 1 hora, a -37 - 43°C usando a placa de liofilizador e liofilizadas usando liofilizador "Alpha 2-4 LSC" (Christ, Alemanha) por 24-48 horas, em pressão de 0,050 mbar e - 20°C,

secagem final a 0,025 mbar e +20°C por 10 a 16 horas. Em ambos os processos de re-suspensão o produto liofilizado poderia ser facilmente reconstituído. O uso de manitol levou a um produto prontamente reconstituído em comparação às formulações sem o crioprotetor, mas tais composições continham uma quantidade significativa de material de lastro e necessitavam de cálculos mais complexos para determinar a concentração real do material ativo.

5 Exemplo 4: liberação in vitro de acetato de glatirâmero a partir de micropartículas de PLGA

Equipamento

- 10 frascos de 20 ml  
 agitador magnético multiponto  
 Incubadora  
 Pipetas  
 Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu 1601

- 15 Reagentes e plástico/vidro

Teste-artigos

- Formulações MPG-02, 03, 04, 05, 05R, 06, 07, 12, 13, 14 e 15-50 mg de micropartículas liofilizadas secas.  
 Formulações MPG-08, 09, 10 e 11 – montante correspondente a 50 mg de micropartículas secas, liofilizadas com 5% de manitol.  
 20 Solução de acetato de glatirâmero de controle de 20-50 µg/mL (como base) em PBS com 0.05% de azida de sódio)

Temperatura: 37°C

- A fim de avaliar a liberação de acetato de glatirâmero incorporado a partir de micropartículas de PLGA biodegradáveis carregadas com acetato de glatirâmero (várias formulações), o seguinte processo foi empregado.

25 Descrição do processo: 20 ml de PBS (0.01M fosfato, 0.05%  $\text{NaN}_3$ ) pH 7.4 foram adicionados a cada frasco. Os frascos foram colocados a 37°C e agitados com um pequeno ímã. Amostras de 600 µl foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos. 500 µl de sobrenadante foram transferidos para um microtubo de 1,5 ml, seguido pela adição de 500 µl de 0.1M de tampão de borato (diluição de 2 vezes) e 50 µl de TNBS. A composição resultante foi misturada tortuosamente e foi mantida no banco por 30 minutos. A análise foi realizada usando o método TNBS.

As partículas precipitadas restantes re-suspensas com 500 µl de PBS fresco (com  $\text{NaN}_3$ ), foram retornadas para o frasco. Cálculo correto para a quantidade liberada de acetato de glatirâmero realizou-se em processo de liberação adicional por 2.5% para cada ponto de tempo.

5 A liberação do acetato de glatirâmero incorporado foi realizado em frascos de vidro de 20ml bem fechados, utilizando incubadora a 37°C, equipado com um agitador magnético multiponto. Salina tamponada com fosfato (PBS), com pH 7,4 foi usada como uma mídia de liberação.

10 A liberação do acetato de glatirâmero foi testado por um período de 10-32 dias.

15 Calculou-se a equação da curva de calibração no intervalo 1-200µg/ml (Shimadzu UV-1601) como:

$$\text{OD}=0.035+0.0132*\text{C} \quad (r^2 = 0.9985)$$

Onde OD=densidade óptica (diferença em 420 e 700 nm)

20 15 C – concentração de base de acetato de glatirâmero, µg/ml

Resultados da liberação de peptídeo de formulações MPG01-MPG07 são mostrados na Figura 1. A liberação mais rápida do acetato de glatirâmero incorporado (40% para os dias 1-10), foi obtida em formulação de MPG-05, baseado em polímero PLGA de baixo peso molecular com grupos terminais de ácido (H Resomer RG 502) e sem contra-íon hidrofóbico. Polímero neutro RG 502 com quantidade relativamente pequena de tocoferil succinato como um contra-íon (MPG-03) também demonstrou liberação significativa (~30% para os dias 2-12), mas com valores de liberação absoluta menores. Formulações contendo quantidades mais elevadas de contra-íons mostraram a supressão da liberação da droga. Sem estar vinculado por qualquer teoria ou mecanismo de ação, isso pode ser atribuído a alta hidrofobia do complexo formado. Além disso, a preparação de micropartículas com DCP ou DMPG foi associada com a formação de agregados e uma distribuição de partícula de grande tamanho.

25 30 O uso de um misturador de alto cisalhamento OMNI GLH maior e mais potente (diâmetro do eixo de 20mm, 5000-30000 rpm em vez de VDI-12 (haste de 12 mm) leva a uma diminuição significativa no tamanho das micropartículas (formulações de 8-11) e maior lisura de superfície. Aumentar a quantidade do solvente orgânico (MPG-02) causou incorporação diminuída do peptídeo nas

micropartículas. Sem estar vinculado por qualquer teoria ou mecanismo de ação, isto é possivelmente atribuído ao tamanho da gotícula da dupla emulsão o/w/o intermediária. Da mesma forma, o uso de polisorbato como surfactante não-iônico, também afetou negativamente o carregamento da droga (MPG-10 com 5 0.2% Tween-80). A adição de contra-íons hidrofóbicos (tocoferil succinato, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG, dicetilfosfato DCP) retardou significativamente a liberação de peptídeo das micropartículas poliméricas em comparação com as formulações sem contra-íon (MPG-05, MPG-05R). Sem estar vinculado a qualquer teoria ou mecanismo de ação, a adição dos contra-íons hidrofóbicos 10 pode fornecer micropartículas com propriedades comprometidas (MPG-06).

A estrutura química do polímero usado mostrou um impacto maior sobre as propriedades de liberação do que o peso molecular da PLGA. Resomers RG 502H e RG 502 (MW cerca de 17.000 Dalton) tiveram coeficientes de difusão muito semelhantes, mas o principal fator a determinar a liberação da forma do 15 peptídeo incluído da matriz polimérica foi uma interação iônica multiponto entre metades de Lys positivamente carregadas de acetato de glatirâmero e grupos terminais carboxílicos em polímero PLGA. Resomer® RG 502 neutro mostrou uma baixa capacidade de ligação, mesmo na presença de um contra-íon (MPG-02, 03), embora Resomer® RG 503 neutro com maior peso molecular tenha 20 demonstrado melhor ligação, mas liberação muito lenta (MPG-10, 11).

Experiments de liberação repetida de formulações indênticas preparadas separadamente (MPG-05 e MPG-05R) mostraram comportamento razoavelmente semelhante e uma boa reproduzibilidade para tais lotes de pequena escala. 25 Formulações de acetato de glatirâmero com Resomer® RG 502H demonstraram um efeito de explosão semelhante (~30%), ligação peptídica inicial boa e rápida liberação de drogas (Figura 2).

Formulação de um complexo equimolar (sal) de tocoferil succinato teve 30 uma alta ligação e solubilidade em água extremamente baixa (~ 5 µg/mL). Sem estar vinculado por qualquer teoria ou mecanismo de ação, isso pode ser causado por uma ligação *cross-linking* iônica diácido (tocoferil succinato) e a molécula de poliamina do polímero. Liberação do polímero a partir desse sal em PBS foi extremamente lenta. Para micropartículas poliméricas, quando tocoferil succinato

incorporou a matriz PLGA, apenas uma parte deste diácido pode interagir com o polímero, e é necessária para supressão completa da liberação de quantidade mais elevada de tocoferil succinato. Assim, a taxa de liberação pode ser regulamentada pelo quociente entre o glatirâmero e PLGA. A quantidade de 5 solvente orgânico usado também pode ser de importância, mas em escala menor.

Formulações 12-15, baseadas em Resomer® RG 502H com diferentes proporções entre a droga e o polímero, mostraram que a relação desempenha um papel importante no controle do efeito da explosão inicial, o nível de ligação e a taxa de liberação. O ajuste da quantidade do PLGA e do peptídeo, bem como a 10 adição de um contra-íon hidrofóbico, tal como tocoferil succinato, permite a preparação de formulações de microparticulas (MPG-12-15) com alta ligação, baixa explosão inicial e taxas razoáveis de liberação (Figura 3).

Exemplo 5: A escala

15 Amostras liofilizadas de formulações de micropartículas de acetato de glatirâmero

MPG-14 SU-1 – formulação de MPG-014 foi produzida a partir de um recipiente de reação maior e um homogeneizador maior(OMNI GLH) em baixa velocidade.

Total-13 frascos; cada frasco continha cerca de 235 mg de formulação 20 liofilizada com teor total de acetato de glatirâmero de ~18.2 mg/frasco, igual a ~75 µg/mg da formulação liofilizada.

MPG-15 SU-1 – formulação de MPG-015 foi produzida a partir de um recipiente de reação maior e um homogeneizador maior (OMNI GLH) em baixa velocidade.

25 Total-10 frascos; cada frasco continha aproximadamente 145 mg da formulação liofilizada com teor total de acetato de glatirâmero de ~14.9 mg/frasco, igual a ~100 µg/mg da formulação liofilizada.

MPG-14 SU-2 – formulação de MPG-014 foi produzida usando o mesmo recipiente de reação, o mesmo homogeneizador (VDI 12) e os mesmos 30 parâmetros, processo repetido várias vezes. Composição foi cuidadosamente lavada para diminuir a explosão inicial.

Total – 12 frascos; cada frasco continha cerca de 88 mg de formulação liofilizada com o conteúdo total do acetato de glatirâmero de ~6.3 mg/frasco, igual a ~72 µg/mg da formulação liofilizada.

5 MPG-15 SU-2 – formulação de MPG-015 foi produzido usando o mesmo recipiente de reação, o mesmo homogeneizador (VDI 12) e os mesmos parâmetros, processo repetido várias vezes. Composição foi cuidadosamente lavada para diminuir a explosão inicial.

10 Total – 12 frascos; cada frasco continha cerca de 55 mg de formulação liofilizada com conteúdo total de acetato de glatirâmero de ~5.6 mg/frasco, igual a ~100 µg/mg da formulação liofilizada.

Todas as amostras liofilizadas foram armazenadas no frigorífico a +4°C e foram reconstituídas antes do uso.

15 A relação entre a formulação e o diluente (solução de glicose) foi de pelo menos 1:5, preferencialmente de 01:10 ou superior. Agitação vigorosa foi realizada antes da administração da amostra de leite reconstituído. Perfis de liberação destas formulações são mostrados nas figuras 4 e 5.

Assim, a incorporação do peptídeo altamente solúvel em água de acetato de glatirâmero em micropartículas poliméricas biodegradáveis foi demonstrada. As micropartículas mostraram boa ligação do polímero, razoável carregamento de 20 droga reduzida explosão de liberação inicial, a qual pode ser regulamentada através do emprego de diferentes composições e processos de preparação. Micropartículas PLGA, feitas de Resomer® 502H e carregadas com acetato de glatirâmero, fornecem a liberação in vitro do peptídeo incorporado com taxa de liberação de 3-5% por dia durante 10-15 dias em um meio aquoso agitado (salina 25 tamponada de fosfato, pH 7,4) a 37°C.

Exemplo 6: Modelo de encefalomielite autoimune Experimental (EAE)

30 Encefalomielite autoimune experimental (EAE) é uma doença desmielinizante autoimune inflamatória que pode ser induzida em animais de laboratório por injeção de proteína básica de mielina. Essa doença tornou-se o modelo padrão de laboratório para o estudo clínico e experimental de doenças autoimunes. De fato, inúmeros artigos (por exemplo, Abramsky et. al., J Neuroimmunol (1982) 21 e Bolton et al., J Neurol Sci. (1982) 56 147) notam que as semelhanças da EAE recidivante crônica em animais e a esclerose múltipla em

humanos implica especialmente o valor da EAE para o estudo de doenças desmielinizantes autoimunes, tais como esclerose múltipla. Como tal, o modelo de teste EAE é empregado para estabelecer a atividade das formulações da presente invenção contra a esclerose múltipla. Esses testes são realizados de 5 acordo com o procedimento a seguir.

Ratas Lewis são injetadas em suas patas com o 12,5 µg de proteína básica de mielina (MBP) (forma preparada da coluna espinhal da cobaia) em adjuvante de *Complete Freund* completo. A formulação da presente invenção é administrada por injeção toda semana/duas semanas/ uma vez por mês em várias dosagens 10 nos animais de teste. Uma formulação de controle é dada a alguns outros animais de teste. Os animais são pesados e marcados diariamente para sintomas da EAE de acordo com uma escala de 0 a 3 (0=nenhuma mudança; 1= cauda flácida; 2= deficiência de membro posterior e 3= paralisia traseira/moribundo). Animais são sacrificados, em seguida, se se chegar a uma pontuação de 3.

15 **Exemplo 7: estudos *In vivo* usando o modelo de EAE**

Para determinar o efeito das formulações da presente invenção no modelo murino de MS, encefalomielite autoimune experimental (EAE) é realizada. Camundongos knockout da D<sub>3</sub>-1α-hidroxilase 25-hidroxivitamina (1 α -OH KO) são mantidos em uma dieta purificada contendo 0,87% de cálcio e 1 ng de 1,25-20 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Vit D) de duas a três semanas antes da imunização da EAE. EAE é induzida em camundongos com seis a dez semanas de idade, por imunização subcutânea de 200 µg do peptídeo imunodominante para glicoproteína de oligodendrócito de mielina (MOG<sub>35-55</sub>).

O peptídeo é sintetizado usando padrão 9-fluorenil-metóxi-carbonila 25 química. O peptídeo é dissolvido em adjuvante completo de Freund (CFA; Sigma) contendo 4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* H837a inativadas por calor.

Os camundongos são examinados diariamente em busca dos sinais clínicos da EAE utilizando o seguinte sistema de pontuação: 0, nenhum sinal; 1, rabo mole; 2, fraqueza do membro posterior; 3, paralisia do membro posterior; 4, 30 paralisia do membro anterior; 5, moribundo ou morte.

Camundongos que desenvolvem sinais clínicos da EAE com pontuações ≥2 são tratados com a formulação da presente invenção, a qual é administrada por injeção a cada semana/duas semanas/ uma vez em várias dosagens. Grupos

de controle são tratados ou com placebo ou com regime de padrão Ouro de acetato de glatirâmero [p. ex. PNAS, 2005, vol. 102, no. 52, 19045–19050]. Camundongos são pesados e pontuados diariamente para sintomas da EAE. Análise estatística é feita usando o teste de probabilidade exata de Fisher bicaudal em taxas de incidência e o teste *t* de Student sem par em todas as outras medidas. Valores de  $P<0.05$  são considerados estatisticamente significativos.

Embora a presente invenção tenha sido particularmente descrita, pessoas versadas na técnica vão apreciar que muitas variações e modificações podem ser feitas. Portanto, a invenção não deve ser interpretada como restrita às modalidades particularmente descritas, e o escopo e o conceito de invenção serão mais facilmente compreendidos por referência às reivindicações, que seguem.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica parenteral de ação prolongada, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma quantia terapeuticamente efetiva de acetato glatirâmero e um transportador biodegradável aceitável farmaceuticamente selecionado do grupo consistindo em poli (D, L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), poli (D, L-lactídeo) (PLA) e poliglicolídeo (PGA), a composição estando em forma *depot* de liberação sustentada, que libera uma quantidade terapeuticamente efetiva do acetato de glatirâmero durante um período de uma semana a 6 meses.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que compreende acetato de glatirâmero na forma *depot* adequada para implantação em um local aceitável medicamente em um sujeito com necessidade deste.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o acetato de glatirâmero compreende L-alanina, L-ácido glutâmico, L-lisina e L-tirosina em proporções molares de 0,14 de ácido glutâmico, 0,43 de alanina, 0,10 de tirosina e 0,33 de lisina; ou

em que o acetato de glatirâmero compreende de 15 a 100 aminoácidos.

4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que é adequada para implantação subcutânea ou intramuscular.

5. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o acetato de glatirâmero está em uma dose variando de 20 até 750 mg.

6. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que está sob a forma de micropartículas preparadas por um processo de emulsificação dupla em água-em-óleo-em-água.

7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que está sob a forma de microesferas biodegradáveis, implantes de qualquer forma geométrica, hastes implantáveis, cápsulas implantáveis, anéis implantáveis ou géis de liberação prolongada ou matrizes erodíveis.

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma fase aquosa interna compreendendo uma quantia terapeuticamente efetiva de um acetato de glatirâmero, uma fase polimérica imiscível em água compreendendo um polímero biodegradável selecionado do grupo consistindo em poli (D,L-lactídeo-co-

glicolídeo) (PLGA), poli (D, L-lactídeo) (PLA) e poliglicolídeo(PGA), e uma fase aquosa externa.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que a fase aquosa externa compreende um surfactante selecionado dentre álcool polivinílico (PVA), polissorbato, copolímeros em bloco de óxido de polipropileno-óxido de polietileno e ésteres de celulose.

10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que é adequado para um cronograma de dosagem de uma vez a cada duas semanas até uma vez mensalmente.

11. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o composto provê eficácia terapêutica igual ou superior a uma forma de dosagem de acetato de glatirâmero injetável diariamente, com incidência reduzida de efeitos colaterais e/ou com severidade reduzida de efeitos colaterais no nível local e/ou sistêmico.

12. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 1 a 11, **caracterizada** pelo fato de que é para uso na preparação de um medicamento para o tratamento de esclerose múltipla.

13. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 1 a 12, **caracterizada** pelo fato de ser para uso na preparação de um medicamento para prover liberação prolongada ou ação prolongada de acetato de glatirâmero em um sujeito.

Figura 1

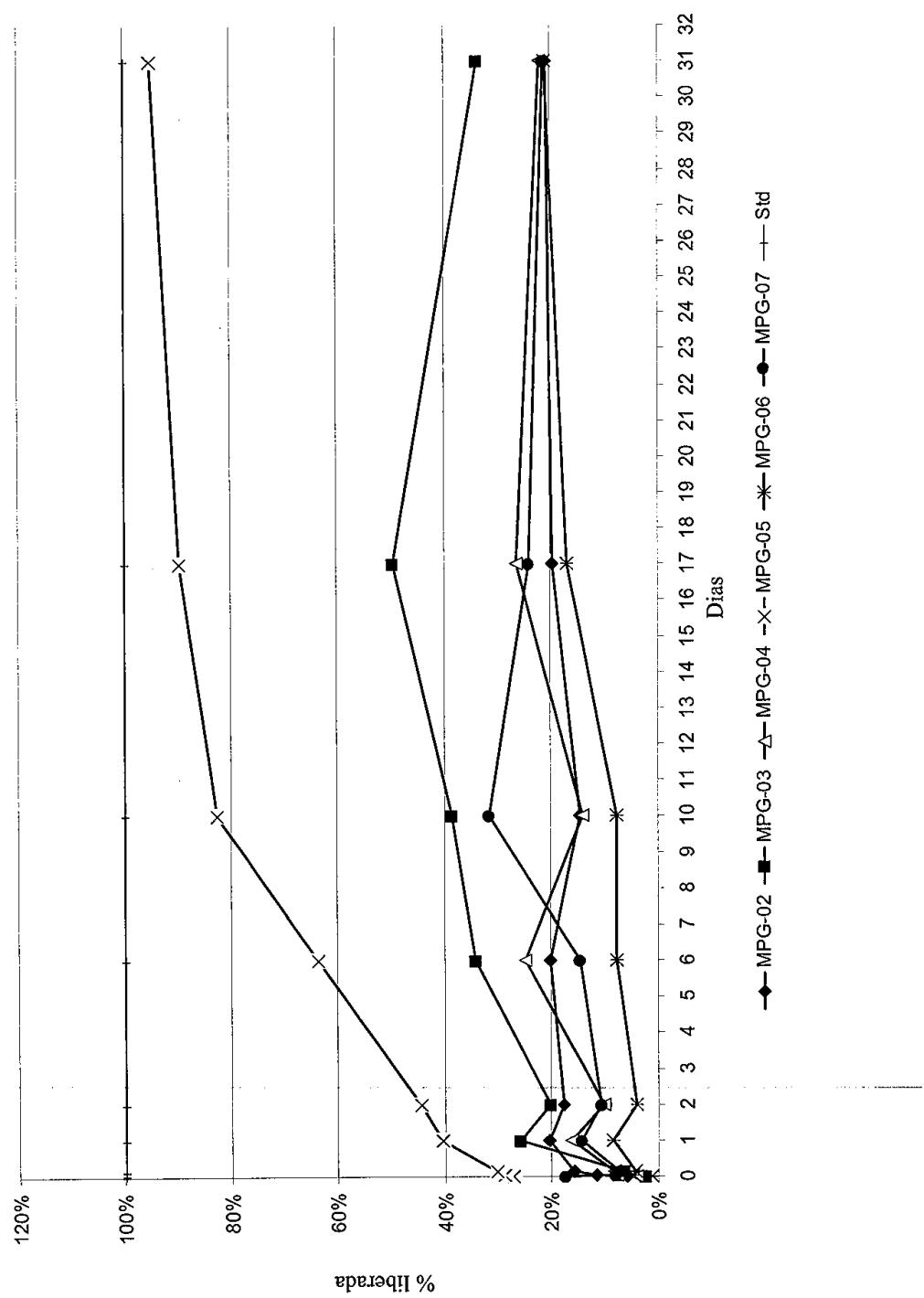


Figura 2

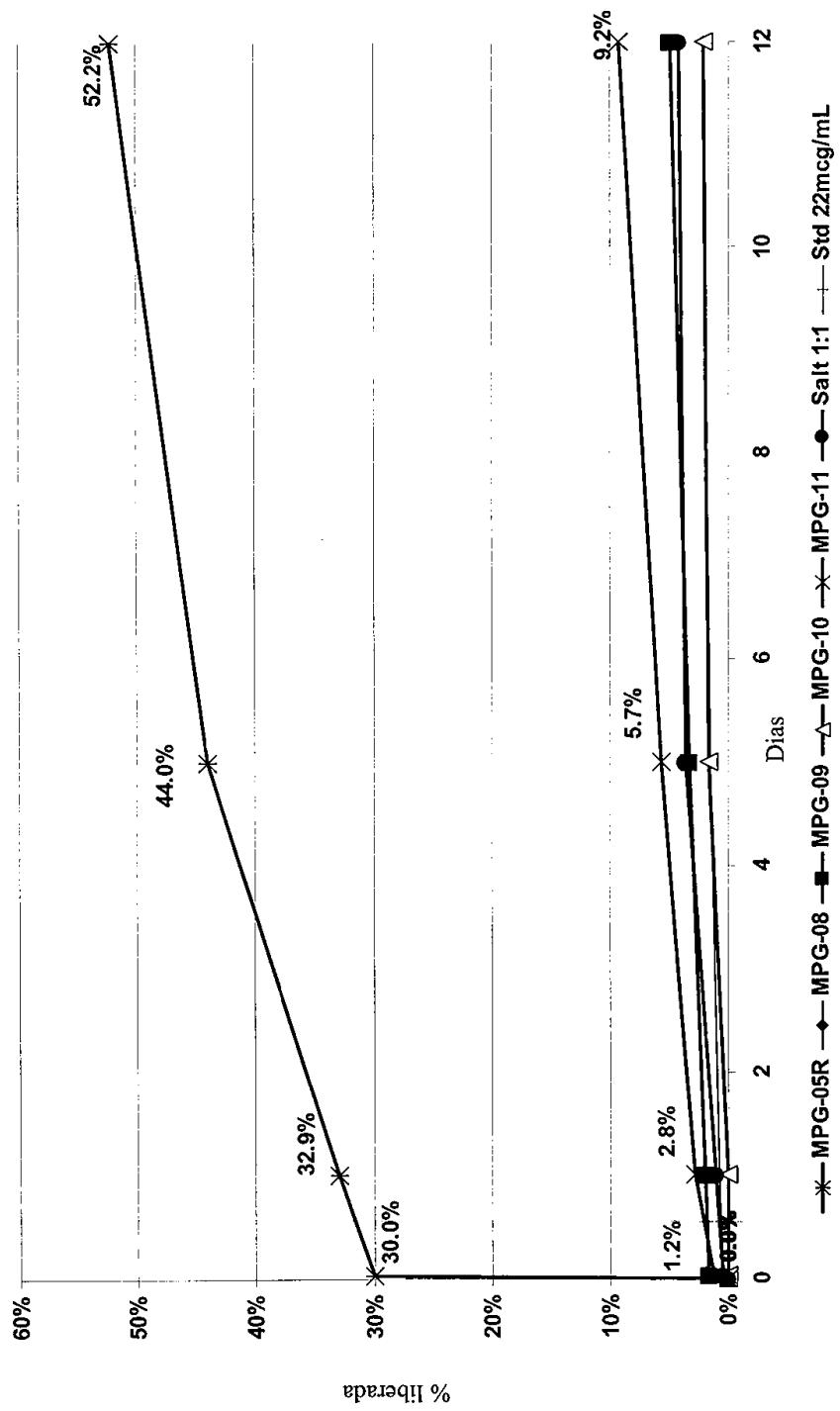


Figura 3

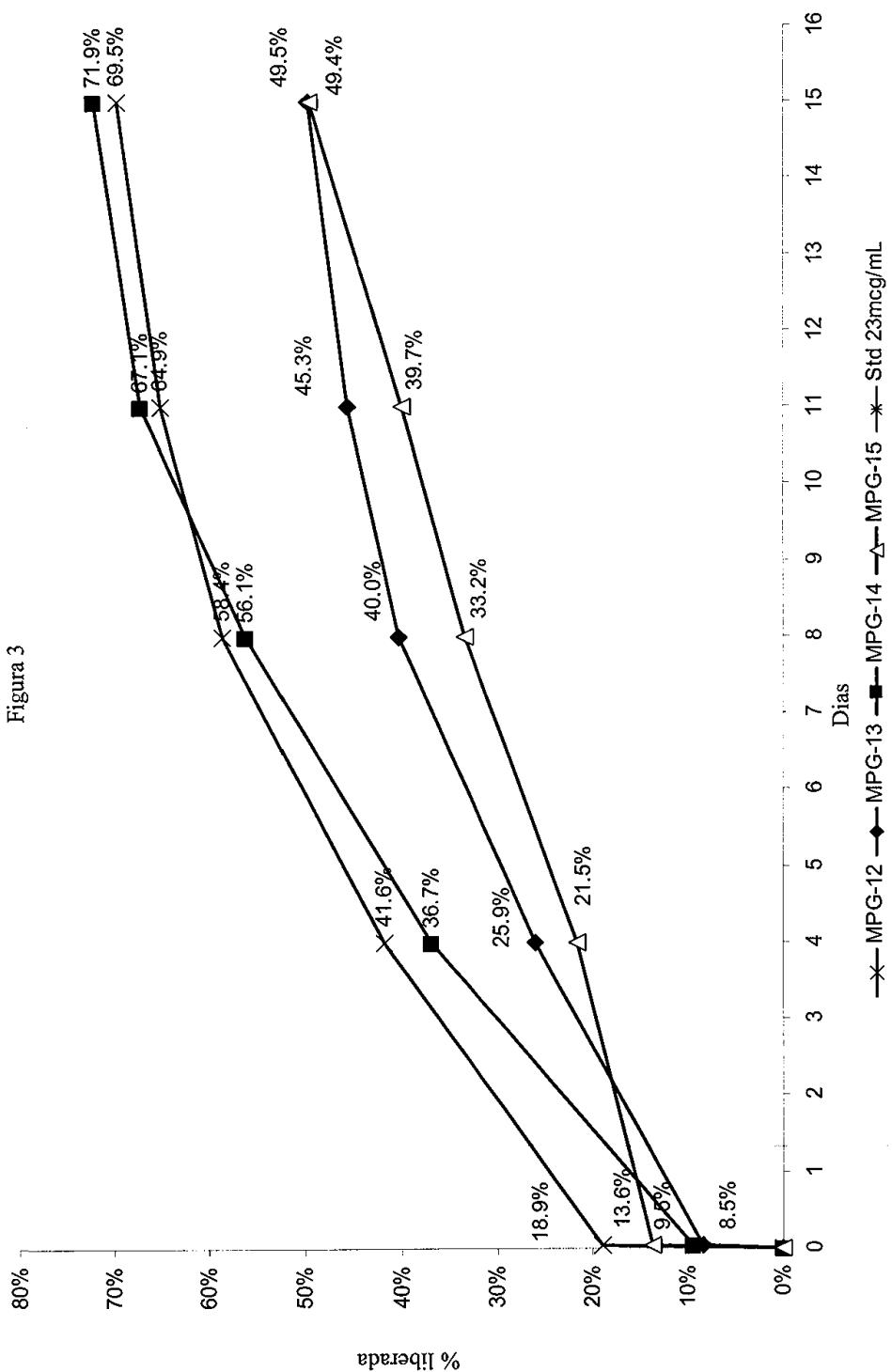


Figura 4

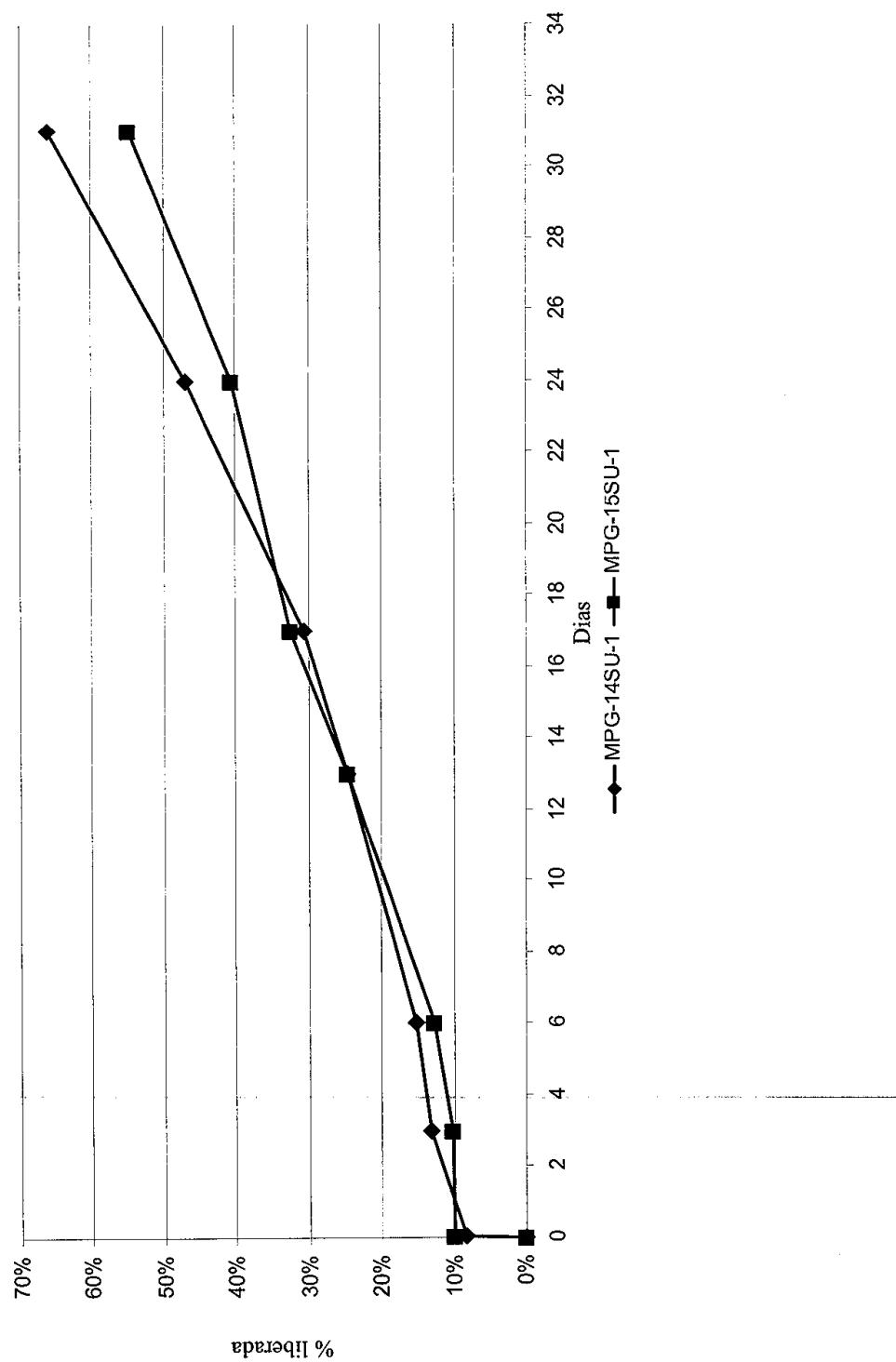


Figura 5

