



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0910338-4 A2



(22) Data do Depósito: 24/03/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 18/08/2020

(54) Título: USO DE VARIANTES PEGULADAS DE IGF-I PARA O TRATAMENTO DE DISTÚBIOS NEUROMUSCULARES

(51) Int. Cl.: A61K 47/48; A61P 25/00.

(30) Prioridade Unionista: 03/04/2008 EP 08153994.2.

(71) Depositante(es): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.

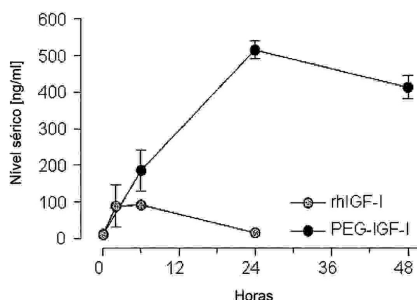
(72) Inventor(es): BETTINA HOLTSMANN; FRIEDRICH METZGER; MICHAEL SENDTNER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009053465 de 24/03/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/121759 de 08/10/2009

(85) Data da Fase Nacional: 30/09/2010

(57) Resumo: USO DE VARIANTES PEGULADAS DE IGF-I PARA O TRATAMENTO DE DISTÚBIOS NEUROMUSCULARES. A presente invenção refere-se ao uso farmacêutico de variantes polietilenoglicol-(PEG)uiladas de IGF-I para o tratamento, prevenção e/ou retardo da progressão de distúrbios neuromusculares, em particular esclerose lateral amiotrófica (ALS). Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao uso de uma variante PEGuilada de IGF-I para a produção de uma composição farmacêutica para o tratamento, prevenção e/ou retardo de distúrbios neuromusculares, em particular ALS em que a variante PEGuilada de IGF-I é caracterizada pelo fato de que é derivada da sequência de aminoácidos de IGF-I humano do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1) e carrega uma ou duas alterações de aminoácido nas posições de aminoácido 27, 65 e 68 para que um ou dois aminoácidos nas posições 27, 65 e 68 seja/sejam um aminoácido polar mas não lisina e PEG seja ligado a pelo menos um resíduo lisina.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE VARIANTES PEGUILADAS DE IGF-I PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS NEUROMUSCULARES"**.

A presente invenção refere-se ao uso farmacêutico de variantes de polietilenoglicol-(PEG)uiladas de IGF-I para o tratamento, prevenção e/ou retardo da progressão de distúrbios neuromusculares, em particular esclerose lateral amiotrófica (ALS). Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao uso de uma variante PEGuilada de IGF-I para a produção de uma composição farmacêutica para o tratamento, prevenção e/ou retardo de distúrbios neuromusculares, em particular ALS em que a variante PEGuilada de IGF-I é caracterizada pelo fato de que é derivada da sequência de aminoácidos de IGF-I humano do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1) e transporta uma ou duas alterações de aminoácidos nas posições de aminoácido 27, 65 e 68 para que um ou dois aminoácidos nas posições 27, 65 e 68 seja/sejam um aminoácido polar mas não lisina e PEG é ligado a pelo menos um resíduo lisina.

Distúrbios neuromusculares cobrem uma faixa de condições incluindo neuropatias (adquiridas ou herdadas), distrofias musculares, ALS, atrofia muscular espinhal (SMA), bem como uma faixa de distúrbios musculares muito raros. Distúrbios neuromusculares afetam os nervos que controlam músculos voluntários. Quando os neurônios tornam-se doentes ou morrem, a comunicação entre o sistema nervoso e músculos entra em colapso. Como resultado, músculos enfraquecem-se e definham. A fraqueza pode levar à contração, espasmos, sofrimentos e dores, e problemas de movimento e articulação. Às vezes também afeta a função cardíaca e sua capacidade de respiração. Há muitas causas de fraqueza muscular progressiva, que pode atacar em qualquer momento da infância até a idade adulta.

Distrofia muscular (MD) é um subgrupo de distúrbios neuromusculares. MD representa uma família de doenças hereditárias dos músculos. Algumas formas afetam crianças (por exemplo, distrofia de Duchenne) e são letais em duas a três décadas. Outras formas se apresentam na vida adulta e são mais lentamente progressivas. Os genes para várias distrofias foram

identificados, incluindo a distrofia de Duchenne (causada por mutações no gene da distrofina) e o início adolescente e adulto da distrofia de Miyoshi ou sua variante, distrofia de cinturas tipo 2B ou LGMD-2B (causado por mutações no gene da disferlina). Estas são mutações com "perda da função" que impedem a expressão da proteína relevante no músculo e por meio disso causam a disfunção muscular. Modelos de camundongo destas mutações existem, surgindo espontaneamente na natureza ou gerados por inativação ou deleção dos genes relevantes. Estes modelos são úteis para testar terapias que poderiam substituir a proteína ausente no músculo e restaurar a função muscular normal.

Distúrbios neuromusculares também incluem doenças de neurônio motor (MND) que pertencem a um grupo de distúrbios neurológicos atribuídos à destruição de neurônios motores do sistema nervoso central e modificações degenerativas na via de neurônio motor, e são diferentes de outras doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, atrofia olivopontocerebelar, etc., que são causadas pela destruição de neurônios além de neurônios motores. O National Institute of Neurological Diseases and Stroke (NINDS) chama os distúrbios degenerativos progressivos de doenças do neurônio motor (MNDs), que afetam nervos nas partes superiores ou inferiores do corpo. Alguns são herdados, de acordo com o NINDS. Geralmente, MNDs atacam na meia-idade. Sintomas podem incluir dificuldade de engolir, fraqueza de membros, discurso pronunciado indistintamente, marcha prejudicada, fraqueza facial e espasmos musculares. Respiração pode ser afetada nos estágios tardios destas doenças. A causa(s) da maioria das MNDs não é conhecida, mas fatores ambientais, tóxicos, virais ou genéticos são todos suspeitos. Formas de MND incluem Atrofia Muscular Espinhal Adulta (SMA), Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS) que também é conhecida como Doença de Lou Gehrig, Atrofia Muscular Espinhal Progressiva Infantil (SMA1) que também é conhecida como SMA Tipo 1 ou Werdnig-Hoffman, Atrofia Muscular Espinhal Intermediária (SMA2) que também é conhecida como SMA Tipo 2, Atrofia Muscular Espinhal Juvenil (SMA3) que também é conhecida como SMA Tipo 3 ou Kugelberg-Welander,

Atrofia Muscular Bulbar Espinhal (SBMA) que também é conhecida como Doença de Kennedy ou SBMA ligada ao X. Doenças de neurônio motor são distúrbios nos quais os neurônios motores degeneram-se e morrem. Neurônios motores, incluindo neurônios motores superiores e neurônios motores inferiores, afetam músculos voluntários, estimulando-os a contrair-se. Neurônios motores superiores originam-se no córtex cerebral e enviam fibras através do tronco encefálico e medula espinhal, e estão envolvidos no controle de neurônios motores inferiores. Neurônios motores inferiores estão localizados no tronco encefálico e na medula espinhal e distribuem fibras aos músculos. Doenças de neurônio motor inferiores são doenças que envolvem degeneração de neurônio motor inferior. Quando um neurônio motor inferior degenera-se, as fibras musculares que normalmente se ativam ficam desligadas e não se contraem, causando fraqueza muscular e reflexos diminuídos. A perda de qualquer tipo de neurônio resulta em fraqueza, atrofia muscular (prejudicial) e fraqueza indolor são características clínicas inconfundíveis de MND.

ALS é uma doença do neurônio motor fatal caracterizada pela perda seletiva e progressiva de neurônios motores na medula espinhal, tronco encefálico e córtex cerebral. Tipicamente leva à fraqueza muscular progressiva e falência respiratória neuromuscular. Aproximadamente 10% de ALS estão associadas com mutações pontuais no gene codificante da enzima superóxido dismutase-1 Cu/Zn (SOD1). A descoberta desta causa genética primária de ALS forneceu uma base para testar várias possibilidades terapêuticas. As atividades neuroprotetoras potentes de fatores neurotróficos (NTFs), variando de prevenção de atrofia neuronal, degeneração axonal e morte celular, geraram uma grande esperança para o tratamento de ALS no início dos anos 90. Fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento similar à insulina 1 (IGF-1) já foram avaliados em pacientes com ALS. A justificativa para testar estes fatores em pacientes com ALS foi baseada nos seus efeitos tróficos sobre paradigmas de morte celular que ocorrem naturalmente durante o desenvolvimento, dano de nervo traumático ou em modelos animais que se parecem

- com ALS, tais como camundongos pmn ou wobbler. Exceto por IGF-1 (Lai EC et al. *Neurology* 1997, 49: 1621-1630), a distribuição sistêmica destas proteínas recombinantes não levou a efeitos clinicamente benéficos em pacientes com ALS (Turner MR. et al. *Semin. Neurol.* 2001; 21: 167-175). Efeitos colaterais indesejáveis e biodisponibilidade limitada complicaram a avaliação de seus benefícios clínicos potenciais. Uma dificuldade prática na aplicação de neurotrofinas consiste em que estas proteínas todas têm uma meia-vida relativamente curta enquanto as doenças neurodegenerativas são crônicas e requerem tratamento a longo prazo.
- 10 Contemporaneamente, várias cepas de camundongos transgênicos superexpressando diferentes mutações de SOD1 ligadas a ALS foram geradas (Newbery HJ et al. *Trends Genet.* 2001; 17: S2-S6). Através de imitação com atenção, muitas das características clínicas e neuropatológicas de ALS, estes camundongos forneceram modelos animais mais relevantes
- 15 para investigar o potencial pré-clínico de fatores neurotróficos. Administração direta de proteínas tróficas recombinantes foi decepcionante. Efeitos benéficos sobre neuropatologia do neurônio motor são sutis ou nulos (Azari MF et al. *Brain Res.* 2003; 982: 92-97; Feeney SJ et al. *Cytokine* 2003; 23: 108-118; Dreibelbis JE et al. *Muscle Nerve* 2002; 25: 122-123). Distribuição mediada por vetor viral de fatores neurotróficos, tais como fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (GDNF), IGF-I ou cardiotrofina-1 (CT-1), entretanto, revelou melhora comportamental ou neuropatológica (Wang LJ et al. *J. Neurosci.* 2002; 22: 6920-6928; Bordet T et al. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10: 1925-1933 e Kaspar BK et al. *Science* 2003, 301: 839-842) sugerindo
- 20 que com um regime de aplicação apropriado, eficácia pode ser alcançada.
- Fator de crescimento similar à insulina (IGF-I) é um hormônio anabólico circulante estruturalmente relacionado à insulina. Na circulação, mais de 99% de IGF-I está ligado a proteínas de ligação a IGF-I (IGFBP'S), que têm afinidades muito altas a IGF'S e modulam a função de IGF-I. O fator
- 30 pode ser localmente liberado a partir de IGFBP'S pela proteólise através de proteases específicas. A fonte principal de IGF-I sérico (~75%) é o fígado (Sjögren, K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1999) 7088-7092; Yakar, S., et

- al., Proc. Natl. Acad. Sci. 96 (1999) 7324-7329) embora IGF-I seja localmente produzido em cada célula do corpo. Além de sua função endócrina, IGF-I tem um papel parácrino no desenvolvimento e maturação cerebral (Werther, G.A., et al., Mol. Endocrinol. 4 (1990) 773-778). Estudos *in vitro* indicam que IGF-I é um agente trófico não seletivo potente para vários tipos de neurônios no SNC (Knusel, B., et al., J. Neurosci. 10 (1990) 558-570; Svrzic, D. and Schubert, D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 172 (1990) 54-60), incluindo neurônios dopaminérgicos (Knusel, B., et al., J. Neurosci. 10 (1990) 558-570), oligodendrócitos (McMorris, F.A., and Dubois-Dalcq, M., J. Neurosci. Res. 21 (1988) 199-209; McMorris, F.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 822-826; Mozell, R.L., and McMorris, F.A., J. Neurosci. Res. 30 (1991) 382-390) e motoneurônios espinhais (Hughes, R.A., et al., J. Neurosci. Res. 36 (1993) 663-671; Neff, N.T., et al., J. Neurobiol. 24 (1993) 1578-1588; Li, L., et al., J. Neurobiol. 25 (1994) 759-766). A entrada de IGF-I periférico no cérebro através do transporte mediado por receptor através da barreira hematoencefálica (BBB) foi demonstrada (Rosenfeld, R.G. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 149 (1987) 159-166; Duffy, K.R., et al., Metab. Clin. Exp. 37 (1988) 136-140; Pan, W. and Kastin, A.J. Neuroendocrinology 72 (2000) 171-178). Dados pré-clínicos gerados principalmente em camundongos transgênicos para SOD1 fornecem forte evidência que IGF-I mostra eficácia em parâmetros relacionados a ALS quando distribuído intratecalmente ou através de dispositivos de liberação lenta ou abordagens gênicas terapêuticas (Kaspar et al., Science 301:839, 2003; Boillee and Cleveland, Trends Neurosci 27:235, 2004; Dobrowolny et al., J Cell Biol 168:193, 2005; Nagano et al., J Neurol Sci 235:61, 2005; Narai et al., J Neurosci Res 82:452, 2005). Isto sugere que uma distribuição constante de IGF-I seja necessária já que dados não publicados existem para eficácia em modelos de ALS na aplicação parenteral de doses de IGF-I adequadas para uso em seres humanos.
- 30 Patente U.S. No. 5.093.317 menciona que a sobrevivência de células neuronais colinérgicas é aumentada pela administração de IGF-I. É conhecido ainda que IGF-I estimula a regeneração de nervo periférico (Kan-

- je, M., et al., Brain Res. 486 (1989) 396-398) e aumenta a atividade de ornitina descarboxilase (Patente U.S. No. 5.093.317). Patente U.S. No. 5.861.373 e WO 93/02695 A1 mencionam um método de tratamento de danos ou doenças do sistema nervoso central que afetam predominantemente
- 5 as células gliais e/ou neuronais não colinérgicas pelo aumento da concentração(ões) ativa de IGF-I e/ou análogos do mesmo no sistema nervoso central do paciente. WO 02/32449 A1 é direcionado a métodos para redução ou prevenção de dano isquêmico no sistema nervoso central de um mamífero pela administração à cavidade nasal do mamífero de uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de IGF-
- 10 I ou variante biologicamente ativa do mesmo. O IGF-I ou variante do mesmo é absorvido pela cavidade nasal e transportado para o sistema nervoso central do mamífero em uma quantidade eficaz para reduzir ou prevenir dano isquêmico associado a um evento isquêmico. EP 0 874 641 A1 reivindica o
- 15 uso de um IGF-I ou um IGF-II para a produção de um medicamento para tratar ou prevenir dano neuronal no sistema nervoso central, devido à demência relacionada à AIDS, AD, Doença de Parkinson, Doença de Pick, Doença de Huntington, encefalopatia hepática, síndromes gangliônicas córtico-basais, demência progressiva, demência familiar com paraparesia espasmódica, paralisia supranuclear progressiva, esclerose múltipla, esclerose cerebral de Schilder ou encefalomielite necrosante hemorrágica aguda, em que o medicamento está em uma forma para administração parenteral de uma
- 20 quantidade eficaz do dito IGF de fora da barreira hematoencefálica ou barreira sangue-medula espinhal.
- 25 Para uso clínico, entretanto, a meia-vida curta de IGF-I na periferia após aplicação exógena é uma desvantagem clara e requer alta frequência de dosagem que gera questões severas. Efeitos colaterais (como hipoglicemia, vista frequentemente em testes clínicos com IGF-I, também vide relatório NDA 21-839
- 30 (http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2005/021839_S000_Increlex_Pharm.pdf) devido à sobrecarga aguda com IGF-I limita a dose tolerada máxima a um nível onde a eficácia sustentada ainda não é alcançada. Para superar esta

desvantagem e alcançar doses mais altas para melhor atividade, um IGF-I modificado com taxa de absorção mais lenta, residência no sangue mais longa e estável, mas mantendo a bioatividade seria necessário. A fim de assegurar que o dito IGF-I modificado ainda possa exercer sua ação neuroprotetora, é também requerido que o transporte da barreira hematoencefálica esteja em pleno funcionamento.

No uso pré-clínico, foi tentado visar pelo menos algumas das dificuldades acima mencionadas pelo encapsulamento de IGF-I em dispositivos de liberação lenta como minibombas e microesferas para suprimento constante sem grande flutuação de composto no sangue (Carrascosa C et al. *Biomaterials* 25; 707-714; WO 03/077940 A1). Entretanto, usando esta abordagem um aumento forte inicial de IGF-I sanguíneo foi observado que gerará os mesmos efeitos colaterais agudos em seres humanos como injeção s.c. de IGF-I.

Surpreendentemente, foi verificado que especificamente variantes PEGuiladas de IGF-I (PEG-IGF-I) quando injetadas parenteralmente têm o perfil farmacocinético necessário. As ditas variantes PEGuiladas de IGF-I não têm nenhuma atividade hipoglicêmica aguda até doses e/ou concentrações plasmáticas > 10 vezes superiores a IGF-I não PEGilado. Seria claramente esperado que PEGuilação prejudicasse ligação e penetração da barreira hematoencefálica mediada por receptor de IGF-I. As variantes PEGuiladas de IGF-I descritas após isto em detalhes são surpreendentemente neuroprotetoras e funcionais em animal, isto é, modelos de camundongo de distúrbios neuromusculares em doses muito mais baixas usadas do que a requerida com IGF-I não PEGuilado, mostrando 1) que o transporte na barreira hematoencefálica está em pleno funcionamento, 2) que a molécula mantém totalmente sua atividade biológica in vivo e 3) que a hipoglicemia é vista somente em doses superiores >10 vezes de PEG-IGF-I em comparação com IGF-I que permite a dosagem ainda mais alta de PEG-IGF-I para a melhor eficácia no homem.

Sumário da Invenção

Em uma primeira modalidade, a presente invenção refere-se a um método para o tratamento de distúrbios neuromusculares pela administração de uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma variante PEGuilada de IGF-I descrita a seguir a um paciente em necessidade da mesma.

Em uma modalidade preferencial, a presente invenção refere-se a um método para o tratamento de MND, em particular ALS pela administração de uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma variante PEGuilada de IGF-I descrita a seguir a um paciente em necessidade da mesma.

Em outra modalidade, a presente invenção refere-se ainda a uma composição farmacêutica compreendendo uma variante PEGuilada de IGF-I descrita a seguir em conjunto com um veículo farmacologicamente aceitável em que a dita composição farmacêutica é útil no tratamento, prevenção e/ou retardo da progressão de distúrbios neuromusculares, preferencialmente MND, e ainda mais preferencialmente ALS.

Um aspecto adicional da invenção refere-se ao uso de uma variante PEGuilada de IGF-I descrita a seguir para a produção de um medicamento para o tratamento de distúrbios neuromusculares, preferencialmente MND, e ainda mais preferencialmente ALS.

Descrição Detalhada da Invenção

A menos que definido de outra maneira, todos os termos técnicos e científicos usados neste pedido têm os mesmos significados que comumente entendidos por um versado na técnica à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos neste pedido possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferenciais são descritos a seguir.

Definições

O termo "distúrbios neuromusculares" engloba doenças e enfermidades que prejudicam diretamente (através da patologia muscular intrínseca) ou indiretamente (através da patologia do nervo) o funcionamento do músculo. Exemplos de distúrbios neuromusculares incluem, mas não são limitados a:

Doenças de neurônio motor como ALS (também conhecida como Doença de Lou Gehrig), Atrofia Muscular Espinhal Tipo 1 (SMA1, Doença de Werdnig-Hoffmann), Atrofia Muscular Espinhal Tipo 2 (SMA2), Atrofia Muscular Espinhal Tipo 3 (SMA3, Doença de Kugelberg-Welander), Atrofia Muscular Bulbar Espinhal (SBMA, também conhecida como Doença de Kennedy e SBMA ligada ao X),

Distrofias Musculares como Distrofia Muscular de Duchenne (DMD, também conhecida como Pseudo-hipertrófica), Distrofia Muscular de Becker (BMD), Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), Distrofia Muscular do tipo Cinturas (LGMD), Distrofia Muscular Facioescapuloumeral (FSH ou FSHD, também conhecida como Landouzy-Dejerine), Distrofia Miotônica (MMD, também conhecida como Doença de Steinert), Distrofia Muscular Oculofaríngeal (OPMD), Distrofia Muscular Distal (DD, Miyoshi), Distrofia Muscular Congênita (CMD).

Doenças metabólicas de músculo como Deficiência de fosforilase (MPD ou PYGM, também conhecida como Doença de McArdle), Deficiência de Maltase Ácida (AMD, também conhecida como Doença de Pompe), Deficiência de Fosfofrutoquinase (também conhecida como Doença de Tarui), Deficiência de Enzima de Desramificação (DBD, também conhecida como Doença de Cori ou Forbes), Miopatia Mitocondrial (MITO), Deficiência de Carnitina (CD), Deficiência de Carnitina Palmitil Transferase (CPT), Deficiência de Fosfoglicerato Quinase, Deficiência de Fosfoglicerato Mutase, Deficiência de Lactato Desidrogenase, Deficiência de Mioadenilato Deaminase, Deficiência de Palmitil Transferase (CPT), Deficiência de Fosfoglicerato Quinase, Deficiência de Fosfoglicerato Mutase, Deficiência de Lactato Desidrogenase, Deficiência de Mioadenilato Deaminase;

Doenças de nervo periférico como Doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT, também conhecida como Neuropatia Motora e Sensorial Hereditária (HMSN) ou Atrofia Muscular Peroneal (PMA), Ataxia de Friedreich (FA), Doença de Dejerine-Sottas (DS),

Miopatias inflamatórias como Dermatomiosite (DM), Polimiosite (PM), Miosite de Corpos de Inclusão (IBM),

Doenças da ligação neuromuscular como Miastenia Gravis (MG), Síndrome de Lambert-Eaton (LES), Síndrome Miastênica Congênita (CMS),

- 5 Miopatias devido à a anormalidades endócrinas como Miopatia Hipertireoidiana (HYPTM), Miopatia Hipotireoidiana (HYPOTM)

Outras miopatias como Miotonia Congênita (MC, também Doença de Thomsen e Becker), Paramiotonia Congênita (PC), Doença de Parte Central (CCD), Miopatia da Nematina (NM)

- 10 Miopatia Miotubular/Miopatia Centronuclear (MTM ou CNM), Paralisia Periódica (PP, duas formas: Hipocalêmica e Hipercalêmica).

- Por "MND" é entendido uma doença que afeta um neurônio com função motora, isto é, um neurônio que transmite impulsos motores. Tais neurônios também são denominados "neurônios motores". Estes neurônios incluem, sem limitação, neurônios alfa da medula espinhal anterior que dão
 15 origem às fibras alfa que enervam as fibras musculares esqueléticas; neurônios beta da medula espinhal anterior que dão origem às fibras beta que enervam fibras musculares extrafusais e intrafusais; neurônios gama da medula espinhal anterior que dão origem a fibras gama (fusimotORES) que enervam fibras intrafusais do fuso muscular; neurônios heterônimos que suprem
 20 músculos além daqueles dos quais os impulsos aferentes se originam; neurônios homônimos que suprem músculos a partir dos quais os impulsos aferentes se originam; neurônios periféricos inferiores cujos corpos celulares estão nas colunas cinzentas ventrais da medula espinhal e cujas terminações estão nos músculos esqueléticos; neurônios periféricos que recebem
 25 impulsos de interneurônios; e neurônios superiores no córtex cerebral que conduzem impulsos do córtex motor a núcleos motores dos nervos cerebrais ou às colunas cinzentas ventrais da medula espinhal.

- Exemplos não limitantes de distúrbios de motoneurônios incluem várias amiotrofias, tais como amiotrofias hereditárias incluindo atrofia muscular
 30 espinal hereditária, atrofia muscular espinal infantil aguda, tal como doença de Werdnig-Hoffman, atrofia muscular progressiva em crianças, tal como tipo proximal, distal e tipos bulbares, atrofia muscular espinal de iní-

cio adolescente ou adulto incluindo os tipos proximal, escapuloperoneal, facioescapuloumeral e distal, esclerose lateral amiotrófica (ALS) e esclerose lateral primária (PLS). Também incluído no termo está dano motoneuronal.

O termo "Esclerose Lateral Amiotrófica" (ou "ALS"), também
 5 chamada de doença de Lou Gehrig, é uma doença fatal que afeta os neurônios motores do córtex, tronco cerebral e medula espinhal. (Hirano, (1996) *Neurology*, 47 (4 Suppl. 2): S63-6). Embora a etiologia da doença seja desconhecida, uma teoria consiste em que a morte celular neuronal em ALS é o
 10 resultado de superexcitação de células neuronais devido ao excesso de glutamato extracelular. Glutamato é um neurotransmissor que é liberado por neurônios glutaminérgicos, e é absorvido em células gliais onde é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase, glutamina então se reintroduz nos neurônios e é hidrolisada por glutaminase para formar glutamato, dessa forma enchendo novamente o agrupamento de neurotransmissores.
 15 Em uma medula espinhal e tronco cerebral normais, o nível de glutamato extracelular é mantido em baixos níveis micromolares no fluido extracelular porque as células gliais, que funcionam em parte para suportar os neurônios, usam proteína transportadora de aminoácido excitatório tipo 2 (EAAT2) para absorver glutamato imediatamente. Uma deficiência na proteína EAAT2
 20 normal em pacientes com ALS foi identificada como sendo importante na patologia da doença (Vide, por exemplo, Meyer et al. (1998) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 65: 594-596; Aoki et al. (1998) *Ann. Neurol.* 43: 645-653; Bristol et al. (1996) *Ann Neurol.* 39: 676-679). Uma explicação para os níveis reduzidos de EAAT2 consiste em que EAAT2 é unida aberrantemente
 25 (Lin et al. (1998) *Neuron*, 20: 589-602). A junção aberrante produz uma variante de junção com uma deleção de 45 a 107 aminoácidos localizados na região C-terminal da proteína EAAT2 (Meyer et al. (1998) *Neurosci Lett.* 241: 68-70). Devido à falta de, ou defeito em EAAT2, glutamato extracelular acumula-se, fazendo neurônios dispararem continuamente. O acúmulo de glutamato tem um efeito tóxico sobre células neuronais porque o disparo contínuo dos neurônios leva à morte celular precoce. Embora muito seja conhecido sobre a patologia de ALS pouco é conhecido sobre a patogênese da for-

ma esporádica e sobre as propriedades causais da proteína SOD mutante em ALS familiar (Bruijn, et al. (1996) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 22: 373-87; Bruijn, et al. (1998) *Science* 281: 1851-54). Muitos modelos foram especulados, incluindo toxicidade de glutamato, hipóxia, estresse oxidativo, agregados proteicos, neurofilamentos e disfunção mitocondrial Cleveland, et al. (1995) *Nature* 378: 342-43; Cleveland, et al. *Neurology*, 47 (4 Suppl. 2): S54-61, discussão S61-20996); Cleveland, (1999) *Neuron*, 24: 515-20; Cleveland, et al. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.*, 2: 806-19; Couillard-Despres, et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9626-30; Mitsumoto, (1997) *Ann. Pharmacother.*, 31: 779-81; Skene, et al. (2001) *Nat. Genet.* 28: 107-8; Williamson, et al (2000) *Science*, 288: 399).

Neste instante, não há cura para ALS, nem há uma terapia que tenha sido provada eficaz para prevenir ou reverter o curso da doença. Vários fármacos foram recentemente aprovados pela Food and Drug Administration (FDA). Até agora, tentativas para tratar ALS envolveram tratamento da degeneração neuronal com álcoois graxos de cadeia longa que têm efeitos citoprotetores (Vide Patente U.S. No. 5.135.956); ou com um sal de ácido pirúvico (Vide Patente U.S. No. 5.395.822); e uso de uma glutamina sintética para bloquear a cascata de glutamato (Vide Patente U.S. 5.906.976). Por exemplo, Riluzol, inibidor de liberação de glutamato, foi aprovado nos EUA para o tratamento de ALS, e parece estender a vida de pelo menos alguns pacientes com ALS em três meses. Entretanto, alguns relatos indicaram que embora a terapia com Riluzol prolongue marginalmente o tempo de sobrevivência, não parece fornecer qualquer melhora da força muscular nos pacientes. Por isso, o efeito de Riluzol é limitado em que a terapia não modifica a qualidade de vida do paciente (Borras-Blasco et al. (1998) *Rev. Neurol.*, 27: 1021-1027).

Como usado a seguir, "peso molecular" significa peso molecular médio de PEG.

"PEG ou grupo PEG" de acordo com a invenção significa um resíduo contendo poli(etilenoglicol) como uma parte essencial. Tal PEG pode conter grupos químicos adicionais que são necessários para reações de li-

gação; que resulta da síntese química da molécula; ou que é um espaçador para distância ótima das partes da molécula entre si. Além disso, tal PEG pode consistir em uma ou mais cadeias laterais de PEG que são ligadas em conjunto. Grupos PEG com mais de uma cadeia de PEG são chamados de

5 PEGs multibraços ou ramificados. PEGs ramificados podem ser preparados, por exemplo, pela adição de óxido de polietileno a vários polióis, incluindo glicerol, pentaeritriol e sorbitol. Por exemplo, um PEG ramificado de quatro braços pode ser preparado de óxido de etileno e pentaeritriol. PEGs ramificados normalmente têm 2 a 8 braços e são descritos em, por exemplo, EP-A

10 0 473084 e Patente U.S. No. 5.932.462. Especialmente preferenciais são PEGs com duas cadeias laterais de PEG (PEG2) ligadas através de grupos amino primários de uma lisina (Monfardini, C, et al., *Bioconjugate Chem.* 6 (1995) 62-69).

"Substancialmente homogêneo" como usado neste pedido significa

15 fica que somente moléculas de variantes PEGuiladas de IGF-I produzidas, contidas ou usadas são aquelas tendo um ou dois grupos de PEG ligados. A preparação pode conter pequenas quantidades de proteína não reagida (isto é, sem grupo PEG). Como apurado por mapeamento peptídico e sequenciamento N-terminal, um exemplo abaixo fornece a preparação que é pelo

20 menos 90% conjugado variante de PEG-IGF-I e a maior parte de 5% de proteína não reagida. Isolamento e purificação de tais preparações homogêneas de variante PEGuilada de IGF-I podem ser realizados por métodos de purificação habituais, preferencialmente cromatografia de exclusão por tamanho.

25 "MonoPEGuilado" como usado neste pedido significa que a variante de IGF-I é PEGuilada em somente uma lisina por molécula variante de IGF-I, pelo que somente um grupo PEG é ligado covalentemente neste sítio. A variante monoPEGuilada pura de IGF-I (sem PEGuilação N-terminal) é pelo menos 80% da preparação, preferencialmente 90%, e ainda mais preferencialmente, monovariante PEGuilada de IGF-I são 92%, ou mais, da preparação, o resto sendo, por exemplo IGF-I não reagido (não PEGuilado)

30 e/ou no N-terminal da variante PEGuilada de IGF-I. As preparações de vari-

antes monoPEGuiladas de IGF-I de acordo com a invenção são, por isso, homogêneas o suficiente para exibir as vantagens de uma preparação homogênea, por exemplo, em uma aplicação farmacêutica. O mesmo aplica-se às espécies diPEGuiladas.

- 5 "Variantes PEGuiladas de IGF-I" ou "PEGuilação aminor-reativa" como usado neste pedido significa que uma variante de IGF-I está ligada covalentemente a um ou dois grupos poli(etilenoglicol) pela ligação aminor-reativa a uma ou duas lisinas da molécula variante de IGF-I. O grupo(s) de PEG é/são ligado aos sítios da molécula variante de IGF-I que são os grupos
- 10 [épsilon]-amino primários das cadeias laterais de lisina. É ainda possível que a PEGuilação ocorra além do grupo [alfa]-amino N-terminal. Devido ao método de síntese e variante usados, variante PEGuilada de IGF-I pode consistir em uma mistura de variantes de IGF-I, PEGuiladas em K65, K68 e/ou K27 com ou sem PEGuilação N-terminal, pelo que os sítios de PEGuilação podem ser diferentes em moléculas diferentes ou podem ser substancialmente
- 15 homogêneos com respeito à quantidade de poli(etilenoglicol) nas cadeias laterais por molécula e/ou o sítio de PEGuilação na molécula. Preferencialmente as variantes de IGF-I são mono- e/ou diPEGuiladas e especialmente purificadas a partir de variantes PEGuiladas de IGF-I no N-terminal.
- 20 "PEG ou poli(etilenoglicol)" como usado neste pedido significa um polímero solúvel em água que está disponível comercialmente ou pode ser preparado pela polimerização por abertura de anel de etilenoglicol de acordo com métodos bem conhecidos na técnica (Kodera, Y., et al., Progress in Polymer Science 23 (1998) 1233-1271; Francis, G.E., et al., Int. J. Hematol. 68 (1998) 1-18. O termo "PEG" é usado largamente para englobar
- 25 qualquer molécula de polietilenoglicol, em que a quantidade de unidades de etilenoglicol (EG) seja pelo menos 460, preferencialmente 460 a 2300 e especialmente preferencialmente 460 a 1840 (230 unidades de EG se referem a um peso molecular de aproximadamente 10 kDa). A quantidade superior
- 30 de unidades de EG somente é limitada pela solubilidade das variantes PEGuiladas de IGF-I. Normalmente PEGs que são maiores do que PEGs contendo 2300 unidades não são usados. Preferencialmente, um PEG usado na

invenção termina em uma extremidade com hidróxi ou metóxi (metóxi PEG, mPEG) e está em outra extremidade ligada covalentemente a uma porção ligante através de uma ligação oxigênio éter. O polímero é linear ou ramificado. PEGs ramificados são, por exemplo, descritos em Veronese, F.M., et al., *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 12 (1997) 196-207.

Um aspecto da presente invenção refere-se a um método para o tratamento de distúrbios neuromusculares, preferencialmente uma doença de neurônio motor e ainda mais preferencialmente ALS pela administração de uma quantidade farmacologicamente eficaz de uma variante PEGuilada de IGF-I a um paciente em necessidade da mesma. Em uma modalidade ainda mais preferencial, a doença a ser tratada é ALS que é causada por um defeito genético que leva à mutação da superóxido dismutase 1.

Esta variante PEGuilada de IGF-I é caracterizada pelo fato de que PEG é ligado a um resíduo lisina de uma muteína de IGF-I humano recombinante que transporta uma ou duas alterações de aminoácido nas posições de aminoácido 27, 65 e 68 da sequência de aminoácidos de IGF-I humano selvagem (SEQ ID NO: 1) para que um ou dois aminoácidos nas posições 27, 65 e 68 seja/sejam um aminoácido polar mas não lisina.

Um "aminoácido polar" como usado neste pedido refere-se a um aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo em cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), histidina (H), asparagina (N), glutamina (Q), arginina (R), serina (S) e treonina (T). Lisina é também um aminoácido polar, mas excluído, já que lisina é substituída de acordo com a invenção. Arginina é preferencialmente usada como aminoácido polar.

Preferenciais são formas PEGuiladas de muteínas de IGF-I humano recombinante que são caracterizadas pelas seguintes alterações de aminoácido da sequência de aminoácidos de IGF-I selvagem (SEQ ID NO: 1):

- (a) K65R e K68R (SEQ ID NO: 2)
- (b) K27R e K68R (SEQ ID NO: 3)
- (c) K27R e K65R (SEQ ID NO: 4).

Preferência especial é dada à forma PEGuilada da muteína de

IGF-I humano recombinante com alterações de aminoácido K27R e K65R (SEQ ID NO: 4) caracterizada pela monoPEGuilação em K68.

Preferência também é dada a composições de uma variante de IGF-I PEGuilada na lisina como descrito acima e uma variante de IGF-I que é PEGuilada N-terminalmente, em que as ditas variantes de IGF-I são idênticas quanto à sequência de aminoácidos primária e em que carregam uma ou duas alterações de aminoácido nas posições de aminoácido 27, 65 e 68 da sequência de aminoácidos de IGF-I humano selvagem (SEQ ID NO: 1) para que um ou dois aminoácidos nas posições 27, 65 e 68 seja/sejam um aminoácido polar mas não lisina. Preferencialmente a razão molecular é 9:1 a 1:9 (razão significa variante de IGF-I PEGuilada na lisina / variante de IGF-I N-terminalmente PEGuilada). É ainda preferencial uma composição em que a razão molar é pelo menos 1:1 (pelo menos uma parte de variante de IGF-I PEGuilada na lisina por uma parte de variante de IGF-I N-terminalmente PEGuilada), preferencialmente pelo menos 6:4 (pelo menos seis partes de variante de IGF-I PEGuilada na lisina por quatro partes de variante de IGF-I N-terminalmente PEGuilada). Preferencialmente tanto variante de IGF-I PEGuilada na lisina como a variante de IGF-I N-terminalmente PEGuilada são monoPEGuiladas. Preferencialmente, nesta composição a variante é idêntica tanto na variante de IGF-I PEGuilada na lisina como na variante de IGF-I N-terminalmente PEGuilada. A variante de IGF-I é preferencialmente selecionada a partir de muteínas de IGF-I tendo as seguintes alterações de aminoácido da sequência de aminoácidos de IGF-I humano selvagem (SEQ ID NO: 1):

- (a) K65R e K68R (SEQ ID NO: 2)
- (b) K27R e K68R (SEQ ID NO: 3)
- (c) K27R e K65R (SEQ ID NO: 4).

Formas PEGuiladas preferenciais de muteínas de IGF-I humano recombinante de acordo com as SEQ ID NOS 2 a 4 são obtíveis seguindo o procedimento para produzir um IGF-I PEGuilado na lisina ou uma variante de IGF-I PEGuilada na lisina, a dita variante compreendendo um ou dois aminoácido(s) selecionados a partir do grupo consistindo em lisina 27, 65 e/ou

68 substituídos independentemente por outro aminoácido polar como descrito em WO 2008/025528 A1 que é completamente incorporado neste pedido por referência. O processo(s) descrito em WO 2008/025528 A1 permite(m) a preparação de muteínas de IGF-I humano recombinante de acordo com as

5 SEQ ID Nos 2 a 4, que não carregam PEGuilação N-terminal.

É ainda preferencial, que a variante PEGuilada de IGF-I seja uma variante na qual até três (preferencialmente todos os três) aminoácidos no N-terminal sejam truncados. O respectivo mutante selvagem é denominado Des(1-3)-IGF-I e não tem os resíduos de aminoácido glicina, prolina e glutamato no N-terminal (Kummer, A., et al., *Int. J. Exp. Diabetes Res.* 4

10 (2003) 45-57).

Preferencialmente o(s) grupo(s) poli(etilenoglicol) têm um peso molecular total de pelo menos 20 kDa, mais preferencialmente de aproximadamente 20 a 100 kDa e especialmente preferencialmente de 20 a 80 kDa.

15 O grupo(s) poli(etilenoglicol) é/são linear(es) ou ramificado(s).

PEGuilação aminorreativa como usada neste pedido indica um método de ligação randômica de cadeias de poli(etilenoglicol) ao grupo(s) amino primário lisina de variante de IGF-I pelo uso de poli(etilenoglicol) reativo (ativado), preferencialmente pelo uso de ésteres de N-hidroxissuccinimidila de, preferencialmente, metoxipoli(etilenoglicol). A reação de ligação acopla poli(etilenoglicol) aos grupos reativos [épsilon]-amino dos resíduos lisina e opcionalmente grupo [alfa]-amino do aminoácido N-terminal de IGF-I. Tal conjugação do grupo amino de PEG a proteínas é bem-conhecida na técnica. Por exemplo, revisão de tais métodos é fornecida

20 por Veronese, F.M., *Biomaterials* 22 (2001) 405-417. De acordo com Veronese, a conjugação de PEG a grupos amino primários de proteínas pode ser realizada pelo uso de PEGs ativados que realizam uma alquilação dos ditos grupos amino primários. Para tal reação, PEGs alquilantes ativados, por exemplo, PEG aldeído, PEG-cloreto de tresila ou PEG epóxido podem ser

25 usados. Reagentes úteis adicionais são PEGs acilantes, tais como ésteres de hidroxissuccinimidila de PEGs carboxilados ou PEGs nos quais o grupo hidróxi terminal é ativado por cloroformiatos ou carbonilimidazol. Reagentes

30

de PEG ainda úteis são PEGs com braços de aminoácido. Tais reagentes podem conter os chamados PEGs ramificados, pelos quais pelo menos duas moléculas de PEG idênticas ou diferentes são ligadas em conjunto por um espaçador peptídico (preferencialmente lisina) e, por exemplo, ligados à variante de IGF-I como carboxilato ativado do espaçador de lisina. A ligação mono-N-terminal também é descrita por Kinstler, O., et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 477-485.

Reagentes de PEG úteis, por exemplo, estão disponíveis em Nektar Therapeutics Inc.

Qualquer massa molecular de um PEG pode ser usada como praticamente desejada, por exemplo, de aproximadamente 20 kDa a 100 kDa (n é 460 a 2300). A quantidade de unidades de repetição " n " no PEG para massa molecular descrita em Dáltons. Por exemplo, se duas moléculas de PEG estão ligadas a um ligante, onde cada molécula de PEG tem a mesma massa molecular de 10 kDa (cada n é aproximadamente 230), então a massa molecular total de PEG no ligante é aproximadamente 20 kDa. As massas moleculares de PEG ligadas ao ligante também podem ser diferentes, por exemplo, das duas moléculas em um ligante, uma molécula PEG pode ter 5 kDa e uma molécula PEG pode ter 15 kDa. Massa molecular significa sempre massa molecular média.

Processos adequados e reagentes preferenciais para a produção de variantes PEGuiladas de IGF-I aminorreativas são descritos em WO 2006/066891. É entendido que modificações, por exemplo, com base nos métodos descritos por Veronese, F.M., *Biomaterials* 22 (2001) 405-417, podem ser feitas nos procedimentos enquanto o processo resulta em variantes PEGuiladas de IGF-I descritas acima. Processos particularmente preferenciais de preparação de variante PEGuilada de IGF-I de acordo com a presente invenção são descritos em WO 2008/025528 A1, que é completamente incorporado neste pedido por referência.

A ocorrência de até três grupos amino primários potencialmente reativos na proteína alvo (até duas lisinas e um aminoácido terminal) leva a uma série de isômeros de variantes PEGuiladas de IGF-I que se diferenciam

no ponto de ligação da cadeia de poli(etilenoglicol).

Variantes PEGuiladas de IGF-I contêm um ou dois grupos PEG lineares ou ramificados e randomicamente ligados a elas, pelo qual o peso molecular total de todos os grupos PEG na variante PEGuilada de IGF-I é preferencialmente aproximadamente 20 a 80 kDa. Pequenos desvios desta faixa de peso molecular são possíveis. Entretanto, é esperado que a atividade diminua conforme o peso molecular aumenta devido à ativação de receptor de IGF-I e transporte de barreira hematoencefálica reduzidos. Por isso, a faixa de 20 a 100 kDa de peso molecular de PEG tem que ser entendida como a faixa otimizada para um conjugado de PEG e variante de IGF-I úteis para um tratamento eficiente de MND, em particular ALS.

Formulações Farmacêuticas

As variantes PEGuiladas de IGF-I descritas anteriormente são caracterizadas por uma estabilidade melhorada na circulação permitindo um acesso sustentado aos receptores de IGF-I em ao longo do corpo com baixos intervalos de aplicação, isto é, intervalos prolongados.

Variantes PEGuiladas de IGF-I podem ser formuladas de acordo com métodos para a preparação de composições farmacêuticas, métodos os quais são conhecidos pelo versado na técnica. Para a produção de tais composições, uma variante PEGuilada de IGF-I de acordo com a invenção é combinada em uma mistura com um veículo farmaceuticamente aceitável, preferencialmente pela diálise contra uma solução aquosa contendo os ingredientes desejados das composições farmacêuticas.

Tais veículos aceitáveis são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, Mack Publishing Company, editado por Oslo et al. (por exemplo, pp. 1435 a 1712). Composições típicas contêm uma quantidade eficaz de substância de acordo com a invenção, por exemplo, de aproximadamente 0,1 a 100 mg/ml, em conjunto com uma quantidade adequada de um veículo. As composições podem ser administradas parenteralmente. O IGF-I PEGuilado de acordo com a invenção é administrado preferencialmente através de aplicação intraperitoneal, subcutânea, intravenosa ou intranasal.

As formulações farmacêuticas de acordo com a invenção podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos na técnica. Normalmente, soluções de variante PEGuilada de IGF-I são dialisadas contra o tampão destinado a ser usado na composição farmacêutica e a concentração proteica final desejada é ajustada por concentração ou diluição.

Tais composições farmacêuticas podem ser usadas para administração por injeção ou infusão, preferencialmente através de aplicação intraperitoneal, subcutânea, intravenosa ou intranasal e conter uma quantidade eficaz da variante PEGuilada de IGF-I em conjunto com diluentes, conservantes, solubilizantes, emulsificantes, adjuvantes e/ou veículos farmacêuticamente aceitáveis. Tais composições incluem diluentes de vários conteúdos de tampão (por exemplo, arginina, acetato, fosfato), pH e força iônica, aditivos, tais como detergentes e agentes solubilizantes (por exemplo Tween (TM) 80/polissorbato, pluronic (TM) F68), antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico, metabissulfito de sódio), conservantes (Timersol(TM), álcool de benzila) e substâncias de volume (por exemplo sacarose, manitol), incorporação do material em preparações particuladas de compostos poliméricos, tais como ácido polilático, ácido poliglicólico, etc. ou em lipossomas. Tais composições podem influenciar a taxa de estabilidade do estado físico de liberação e depuração de variantes PEGuiladas de IGF-I.

Dosagens e Concentrações de Fármaco

Tipicamente, em um regime de tratamento padrão, os pacientes são tratados com dosagens na faixa entre 0,001 a 20 mg, preferencialmente 0,01 a 8 mg de variante PEGuilada de IGF-I por kg por semana ao longo de certo período de tempo, durando de uma semana a aproximadamente 3 meses ou ainda mais longo. O fármaco é aplicado como uma injeção em bolus s.c., i.v. ou i.p. (intraperitoneal) semanal única ou infusão de uma formulação farmacêutica contendo 0,1 a 100 mg de uma variante PEGuilada de IGF-I descrita anteriormente por ml. Este tratamento pode ser combinado com qualquer tratamento padrão (por exemplo, quimioterápico), pela aplicação de IGF-I PEGuilado antes, durante ou após tratamento padrão. Isto resulta em um resultado melhorado em comparação com o tratamento padrão sozinho.

Foi verificado que as variantes PEGuiladas de IGF-I descritas anteriormente podem ser administradas somente uma ou duas vezes por semana para tratamento bem-sucedido. Um método de tratamento de uma distúrbio neuromuscular, preferencialmente uma MND, e ainda mais preferencial ALS, por isso, deve compreender administração a um paciente em necessidade das mesmas de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma variante PEGuilada de IGF-I descrita anteriormente com uma dosagem na faixa entre 0,001 e 3 mg, preferencialmente 0,01 e 3 mg de variante PEGuilada de IGF-I por kg e por 3 a 8 dias, preferencialmente por 7 dias. Como variante PEGuilada de IGF-I é preferencialmente usada uma variante de IGF-I monoPEGuilada.

As variantes PEGuiladas de IGF-I descritas anteriormente podem ser usadas para a preparação de um medicamento para tratamento de uma distúrbio neuromuscular, preferencialmente uma MND, e ainda mais preferencial ALS que é administrada a um paciente em necessidade das mesmas em uma quantidade terapeuticamente eficaz e com uma ou duas dosagens na faixa entre 0,001 e 3 mg, preferencialmente 0,01 e 3 mg de variante PEGuilada de IGF-I por kg e por 6 a 8 dias, preferencialmente por 7 dias. Como variante PEGuilada de IGF-I é preferencialmente usada uma variante de IGF-I monoPEGuilada.

As variantes PEGuiladas de IGF-I descritas anteriormente também podem ser usadas separadamente, sequencialmente ou simultaneamente em uma combinação combinada com um segundo composto farmacologicamente ativo para o tratamento de uma distúrbio neuromuscular, preferencialmente uma MND, e ALS até mais preferencial. Preferencialmente, o segundo composto farmacologicamente ativo da combinação é pelo menos um neuroprotetor tendo um efeito inibitório sobre a liberação de glutamato ou efeito de inativação de canais de sódio dependentes de voltagem ou a capacidade de interferir em eventos intracelulares que seguem a ligação do transmissor em receptores de aminoácido excitatórios.

O segundo composto farmacologicamente ativo é preferencialmente riluzol. Riluzol bloqueia canais de sódio TTX-S, que estão associados

a neurônios danificados (Song JH, Huang CS, Nagata K, Yeh JZ, Narahashi T. Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997; 282: 707-14). Isto reduz o influxo de íons cálcio e previne indiretamente a estimulação de receptores de glutamato. Em conjunto com o bloqueio direto de receptor de glutamato, o efeito do neurotransmissor de glutamato em neurônios motores é reduzido.

O termo "riluzol" como usado neste pedido refere-se a 2-amino-6-(trifluorometóxi)benzotiazol, 6-(trifluorometóxi)benzotiazol-2-amina ou CAS-1744-22-5. Em um amplo sentido desta modalidade, o termo "riluzol" também compreende ingredientes ativos tendo pelo menos uma propriedade farmacológica também observada com riluzol selecionado a partir de um efeito inibitório sobre liberação de glutamato, inativação de canais de sódio dependentes de voltagem e capacidade de interferir em eventos intracelulares que seguem a ligação do transmissor em receptores de aminoácido excitatórios. O uso de riluzol em ALS é descrito em US 5.527.814, o composto e sua preparação são descritos em EP 050 551. Outros compostos neuroprotetores podem ser preparados como descrito, por exemplo, por Yagupolskii et al em Zhurnal Obschei Khimii 33 (7), 2301-7 (1963).

Os seguintes exemplos, referências e figuras são fornecidos para auxiliar a compreensão da presente invenção, o escopo verdadeiro do qual é apresentado nas reivindicações adicionadas. É entendido que modificações podem ser feitas nos procedimentos apresentados sem se afastar do espírito da invenção.

25 Listagem de Sequências

SEQ ID NO: 1

Sequência de aminoácidos de IGF-I humano selvagem (aminoácidos 1 a 70 da proteína precursora IGF-I de acordo com SwissProt P01343).

30 SEQ ID NO: 2

Sequência de aminoácidos da muteína de IGF-I humano carregando trocas de aminoácido K65R e K68R.

SEQ ID NO: 3

Sequência de aminoácidos da muteína de IGF-I humano carregando trocas de aminoácido K27R e K68R.

SEQ ID NO: 4

- 5 Sequência de aminoácidos da muteína de IGF-I humano carregando trocas de aminoácido K27R e K65R.

Breve Descrição das Figuras

- 10 A figura 1 mostra a detecção sérica após injeção s.c. de 100 µg/kg de rhIGF-I ou PEG-IGF-I em camundongos. Os níveis séricos de PEG-IGF-I ou rhIGF-I foram detectados em pontos de tempo indicados por técnicas ELISA.

- 15 A figura 2 mostra imunorreatividade de IGF-I em neurônios CA1 do hipocampo após injeção s.c. de rhIGF-I ou PEG-IGF-I (100 µg/kg) em camundongos. Em pontos de tempo indicados, os cérebros foram removidos e imunomarcados com hIGF-I. As imagens digitais da região CA1 do hipocampo foram analisadas para marcar a intensidade dentro dos neurônios.

- 20 A figura 3 mostra níveis de glicose plasmática após injeção s.c. de PEG-IGF-I (200 a 5000 µg/kg) em cães beagle. Níveis de glicose foram estimados de gotas de sangue nos respectivos pontos de tempo usando o dispositivo Roche AkkuCheck. A flecha indica a única ocorrência significativa de hipoglicemia severa no cão macho na dose de 5000 µg/kg.

- 25 A figura 4 mostra a sobrevivência *in vitro* de motoneurônios primários de camundongo após tratamento de 5 dias com rhIGF-I ou PEG-IGF-I. Os motoneurônios primários de camundongos C57Bl/6 foram cultivados em presença ou ausência de PEG-IGF-I ou rhIGF-I em concentrações diferentes e sobrevivência estimada pela microscopia de contraste de fase em 5 dias *in vitro*.

- 30 A figura 5 mostra força de aperto de camundongos pmn tratados com veículo ou 150 µg/kg de PEG-IGF-I s.c. q2d. Os animais foram testados semanalmente quanto à força muscular de membros dianteiros, números indicam animais analisados por ponto de tempo (**, p <0,01).

A figura 6 mostra que o desempenho de rotarod de camundon-

gos pmn tratados com veículo ou 150 µg/kg de PEG-IGF-I s.c. q2d. Animais foram testados semanalmente quanto à coordenação motora, números indicam animais por ponto de tempo (*, $p < 0,05$).

5 A figura 7 mostra que a sobrevivência de motoneurônio no núcleo facial de camundongos pmn tratados com veículo ou PEG-IGF-I (150 µg/kg s.c. q2d). Os animais foram mortos no dia 34 pós-natal e tecido processado para histologia. Exame estereológico de números de motoneurônio foi realizado às cegas, valores expressos de números totais por camundongo (**, $p < 0,01$).

10 A figura 8 mostra que a sobrevivência de motoneurônio na medula espinhal lombar de camundongos pmn tratados com veículo ou PEG-IGF-I (150 µg/kg s.c. q2d). Os animais foram mortos no dia 34 pós-natal e tecido processado para histologia. Exame estereológico de números de motoneurônio foi realizado às cegas, valores expressos de números totais por
15 camundongo (***, $p < 0,001$).

A figura 9 mostra que os números de axônios mielinizados no nervo frênico proximal de camundongos pmn tratados com veículo ou PEG-IGF-I (150 µg/kg s.c. q2d). Os animais foram mortos no dia 34 pós-natal e tecido processado para histologia. Exame estereológico de números de axô-
20 nios mielinizados foi realizado às cegas, valores expressos de números totais por nervo frênico (*, $p < 0,05$).

A figura 10 mostra que os números de axônios mielinizados no nervo frênico distal de camundongos pmn tratados com veículo ou PEG-IGF-I (150 µg/kg s.c. q2d). Os animais foram mortos no dia 34 pós-natal e tecido
25 processado para histologia. Exame estereológico de números de axônios mielinizados foi realizado às cegas, valores expressos de números totais por nervo frênico (**, $p < 0,01$).

A figura 11 mostra análise de peso corporal de camundongos SOD1 (G93A) tratados com veículo ou PEG-IGF-I (150 µg/kg s.c. q3.5d). O
30 peso corporal foi avaliado semanalmente e os valores foram normalizados para o peso corporal no primeiro exame que foi estabelecido em 100% (*, $p < 0,05$).

A figura 12 mostra início de doença em camundongos SOD1 (G93A) tratados com veículo ou PEG-IGF-I (150 µg/kg s.c. q3.5d). Os animais foram examinados semanalmente e início de doença definido por fraqueza do membro traseiro, andadura anormal e dificuldade de manter-se em uma rede de arame invertida. O gráfico de Kaplan-Meier mostra início de doença em camundongos individuais tratados a partir da semana 34 pós-natal. O gráfico de barras mostra a idade média no início da doença de ambos os grupos ($p < 0,05$).

A figura 13 mostra força de aperto de camundongos SOD1 (G93A) tratados com veículo ou PEG-IGF-I (150 µg/kg s.c. q3.5d). Os animais foram testados semanalmente para força muscular de membros dianteiros. Análise de LOCF de animais que morrem durante o curso de tempo foi realizada pela inclusão dos últimos valores medidos nos dados adicionais (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

A figura 14 mostra desempenho de rotarod de camundongos SOD1 (G93A) tratados com veículo ou PEG-IGF-I (150 µg/kg s.c. q3.5d). Animais foram testados semanalmente para coordenação motora. Análise de LOCF de animais que morrem durante o curso de tempo foi realizada pela inclusão dos últimos valores medidos nos dados adicionais (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

A figura 15 mostra ações *in vivo* de PEG-IGF-I relacionado à unidade neuromuscular como demonstrado nos modelos de camundongo de ALS. Foi mostrado que PEG-IGF-I melhora a função neuromuscular bem como também protege axônios motores e motoneurônios no tronco cerebral e medula espinhal e por isso é sugerido atuar sobre todas as partes responsáveis pela manutenção da junção neuromuscular.

Métodos:

Culturas de camundongo de motoneurônio embrionário

Culturas de motoneurônios espinhais de camundongos embrionários do dia 12,5 foram preparadas por uma técnica de seleção usando um anticorpo monoclonal anti-p75 de rato (Chemicon, Hofheim, Alemanha). As partes ventrolaterais de medulas espinhais lombares individuais foram dis-

secadas e transferidas para HBSS contendo 2-mercaptoetanol a 10 μ M. Após tratamento com tripsina (0,05%, 10 minutos), suspensões de célula única foram geradas por trituração. As células foram plaqueadas em um prato de cultura recoberto com anti-p75 de rato (Greiner, Nürtingen, Alemanha) e deixadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Os poços individuais foram posteriormente lavados com solução salina balanceada de Hank (HBSS; 3 vezes), e as células de ligação então foram isoladas da placa com solução salina despolarizante (NaCl 0,8%, KCl a 35 mM e 2-mercaptoetanol a 1 μ M). As células foram plaqueadas em uma densidade de 3000 células/poço em placas de cultura de 4 poços (Greiner), pré-recobertas com poliornitina e laminina como descrito (Miller, T. M. et al., J. Biol. Chem. 272, 9847-9853, 1997). Células foram cultivadas em meio Neurobasal (Life Technologies, Karlsruhe, Alemanha), suplemento B27, soro de cavalo 10%, glutamax a 500 μ M e 50 μ g/ml de apotransferrina a 37°C em uma atmosfera de CO₂ a 5%. Cinquenta por cento do meio foram primeiro substituídos no dia um e então de dois em dois dias. Contagem inicial de células plaqueadas foi feita quando todas as células foram ligadas à placa de cultura, após 4 horas. As células na fase brilhante então foram adicionalmente contadas no dia cinco. Dez campos (1,16 mm²/campo) foram contados em cada poço em cada ponto de tempo.

Níveis séricos de rhIGF-I ou PEG-IGF-I e marcação de IGF-I intraneuronal em neurônios CA1

Para estimativa de níveis séricos de rhIGF-I ou PEG-IGF-I, amostras de sangue de camundongos C57Bl/6 foram tomadas em pontos de tempo diferentes (n=4 camundongos por ponto de tempo) após uma injeção s.c. única de 100 μ g/kg de rhIGF-I ou de PEG-IGF-I. O soro foi preparado e processado por ensaios de ELISA. Para detecção de rhIGF-I, um ensaio de rhIGF-I comercial (DSL) foi usado. Para detecção de PEG-IGF-I, microplacas de ensaio recobertas com estreptavidina foram recobertas com um anticorpo de captura anti-PEG (IgM) biotilado. Amostras séricas foram incubadas por 15 h com IGFBP-4 digoxigenada para substituir qualquer ligação de IGF-I por IGFBP's endógenas por IGFBP-4. Após lavagem, as placas foram incu-

badas com anti-Dig-POD (Fab) e detectadas pela reação de cor ABTS. Sinais de absorvância foram quantificados com leitor SpectraMax M2^e em 405 nm e 490 nm.

- Em pontos de tempo diferentes após uma injeção s.c. única de
- 5 100 µg/kg de rhIGF-I ou de PEG-IGF-I, camundongos C57Bl/6 foram decapitados sob anestesia com isoflurano e cérebros removidos. Os hemisférios foram congelados instantaneamente em gelo seco e pós-fixados em paraformaldeído (4% em solução salina tamponada em fosfato, PBS). Posteriormente, cortes sagitais de 40 µm foram cortadas com um vibrátomo (Zeiss).
 - 10 Para análise semiquantitativa de imunorreatividade, 24 cortes foram cortados começando a 2 mm da borda lateral. Todo quarto corte foi usado para contagem, revelando 6 cortes no total por camundongo. Os cortes foram imunomarcados com um anticorpo de Cabra anti-hIGF-I (R&D Systems) e contramarcados com corante nuclear. Detecção secundária foi realizada pela
 - 15 marcação com anti-Cy3 de Cabra de burro (Jackson). Fotos digitais de neurônios CA1 foram avaliadas totalmente às cegas usando uma câmera PixelFly (Klughammer) em intensidade e marcação de intensidade idênticas através da camada celular CA1 semiautomaticamente adquirida usando o programa ImagePro 4.5 (Media Cybernetics). Foi calculada a média dos valores
 - 20 de intensidade de 6 cortes por camundongo.

Estimativa de glicose sanguínea

- Cães beagle foram tratados com PEG-IGF-I (200 a 5000 µg/kg s.c.) e amostras de sangue tomadas após intervalos de tempo diferentes até
- 25 6 dias (144 h). Glicose sanguínea foi avaliada de gotas de sangue usando o dispositivo AkkuCheck (Roche).

Avaliação funcional

- Camundongos foram regularmente monitorados para avaliar o início de doença que foi definido quando os camundongos exibiram fraqueza do membro traseiro, andadura anormal e dificuldade de manter-se em uma
- 30 rede de arame invertida. O início da doença em camundongos transgênicos SOD1 (G93A) é variável (Gurney et al., Science 264 (5166):1772-1775, 1994) enquanto ocorre em camundongos pmn durante a terceira semana

após nascimento (Schmalbruch et al., J Neuropathol Exp Neurol 50 (3):192-204, 1991). A fim de avaliar a fraqueza que se desenvolve, camundongos mutantes foram submetidos semanalmente a testes motores funcionais começando no dia 24 pós-natal (camundongos pmn mutantes) ou semana 34

5 pós-natal (camundongos mutantes SOD de G93A). A força de aperto de pata dianteira (em Newtons) foi registrada pelo cálculo da média de 5 testes de um medidor de força de aperto eletrônico (Columbus Instruments, Columbus, Ohio). Além disso, camundongos foram testados quanto a sua capacidade de manter o equilíbrio em um aparelho rotarod (Hugo Basile Bio. Res. App.)

10 enquanto a haste sofreu uma aceleração linear de 4 a 40 rpm (ciclos por minuto). O tempo (segundos) mantido na haste por cada camundongo (latência) foi registrado 3 vezes por sessão. Valores médios em 24 dias pós-natal (camundongos pmn) ou semana 34 pós-natal (camundongos SOD1) foram considerados como 100% e os resultados das análises subsequentes foram

15 normalizadas contra este valor.

Análise histológica

O número de corpos celulares de motoneurônios no núcleo facial e medula espinhal lombar de camundongos pmn tratados com PEG IGF-I e veículo (isto é, respectivo tampão sem PEG IGF-I) foi determinado no dia 34

20 pós-natal. Além disso, o número de axônios mielinizados na parte proximal e distal de nervos frênicos foi contado nestes mutantes de camundongo. Animais foram perfundidos transcardialmente com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato a 0,1 M em pH 7,4 e tronco encefálico e medula espinhal lombar (L1 a L6) foram dissecados. Seções seriadas foram cortadas da região de tronco cerebral (7 μ m) incluindo os núcleos faciais e da medula espi-

25 nhal lombar (12,5 μ m). Após marcação de Nissl, os motoneurônios foram contados em cada 5ª (núcleo facial) ou 10ª seção (medula espinhal) e as contagens brutas foram corrigidas para núcleos de divisão (Masu et al., Nature 365:27-32, 1993). Nervos frênicos foram pós-fixados durante a noite em

30 tampão cacodilato a 0,1 M contendo paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2%. Após osmificação e desidratação, todas as amostras foram introduzidas em meio de Spurr. Seções de cruzamento semifinas (0,5 μ m) para exame

em microscopia ótica foram cortadas com uma faca de vidro e marcadas com azur-metilenoblue. O número de fibras mielinizadas intactas foi determinado a partir de fotografias tomadas de seções de cruzamento de nervo sob um microscópio ótico Leica (Nussloch, Alemanha) equipado com uma câmera digital (ActionCam; Agfa, Mortsel, Bélgica).

Exemplos

Exemplo 1:

Para estimar a exposição sistêmica de rhIGF-I e PEG-IGF-I, níveis de fármaco após injeção s.c. única de 100 µg/kg de rhIGF-I ou PEG-IGF-I foram estimados em camundongos C57Bl/6 usando ensaios de detecção específicos. Por meio disso, PEG-IGF-I mostrou tanto uma meia-vida fortemente prolongada bem como exposição sérica superior em comparação ao rhIGF-I (figura1). Para investigar ainda se esta exposição periférica aumentada traduz-se no cérebro, cortes cerebrais destes camundongos foram imunomarcados com um anticorpo que reconhece IGF-I humano e marcação intraneuronal na região CA1 foi avaliada. A marcação de IGF-I de neurônios CA1 foi aumentada em 2 e 6 h após injeção s.c. de rhIGF-I mas voltou a níveis basais após 24 h (figura 2). Ao contrário, a marcação de IGF-I aumentada foi observada em 24 e 48 h após injeção de PEG-IGF-I e alcançando níveis superiores em 48 h (figura2). Estes dados mostram que a entrada cerebral tanto de rhIGF-I como de PEG-IGF-I mostra cinética similar à exposição periférica e indica que a exposição periférica muito mais alta de PEG-IGF-I em comparação com rhIGF-I se traduz na entrada cerebral melhor e mais sustentada de PEG-IGF-I em comparação a rhIGF-I.

Exemplo 2:

Em testes toxicológicos em cães beagle, rhIGF-I mostrou um grande potencial para induzir agudamente hipoglicemia até em doses relativamente baixas de 150 µg/kg dadas s.c. (relato 21-839 de NDA). Para analisar o potencial hipoglicêmico de PEG-IGF-I, cães beagle machos e fêmeas foram tratados com uma dose única de PEG-IGF-I variando de 200 a 5000 µg/kg s.c. Como mostrado na figura 3, até 2000 µg/kg nenhuma hipoglicemia consistente foi observada. Entretanto, na dose de 5000 µg/kg um dos dois

cães sofreu uma hipoglicemia severa (vide flecha na figura 2) e teve que ser recuperado por infusão de glicose; consequentemente, o teste de glicose foi parado neste ponto de tempo. Tomado em conjunto, estes dados demonstram que até 2000 µg/kg s.c. de PEG-IGF-I não tem um potencial hipoglicêmico similar à hipoglicemia observada com rhIGF-I em 150 µg/kg (relato 21-839 de NDA).

Exemplo 3:

Para investigar a atividade *in vitro* de PEG-IGF-I relacionado a rhIGF-I, ambos os compostos foram comparados quanto a sua eficácia na sobrevivência de motoneurônio. Motoneurônios primários de embriões de camundongo C57Bl/6 12,5 E de idade foram cultivados na ausência ou na presença de concentrações diferentes de rhIGF-I ou PEG-IGF-I e sobrevivência de motoneurônios contados após 5 dias por microscopia de contraste de fase. Como mostrado na figura 4, ambos os compostos mostraram eficácia idêntica na proteção de motoneurônios. Os dados indicam que rhIGF-I e PEG-IGF-I têm atividade biológica idêntica.

Exemplo 4:

Para rhIGF-I, vários regimes de dosagem local ou sustentada mostraram eficácia em camundongos SOD1 (G93A), um modelo animal amplamente usado para ALS (Kaspar et al., Science 301:839, 2003; Dobrowolny et al., J Cell Biol 168:193, 2005; Nagano et al., J Neurol Sci 235:61, 2005; Narai et al., J Neurosci Res 82:452, 2005). Por isso, investigou-se a eficácia *in vivo* de PEG-IGF-I, aplicado s.c. em 150 µg/kg pouco antes do início clínico da doença em dois modelos independentes de ALS, camundongos pmn e camundongos SOD1 (G93A).

Para teste de PEG-IGF-I em um modelo de ALS esporádico, camundongos pmn foram usados (Bommel et al., J Cell Biol 159:563, 2002). Este modelo de ALS desenvolve primeiro sintomas de prejuízo funcional por duas semanas após nascimento que resulta em morte em 5 a 6 semanas pós-natal. Camundongos pmn, por isso, foram tratados de dois em dois dias (q2d) com veículo (n=12) ou 150 µg/kg de PEG-IGF-I (n=13) s.c. a partir do dia 13 pós-natal, isto é, no momento em que a doença somente começou.

Usando estimativa semanal da força muscular dos membros dianteiros pela análise da força de aperto, um efeito claro de PEG-IGF-I foi observado no dia 45 pós-natal onde camundongos pmn sobreviventes tratados com PEG-IGF-I mostraram desempenho significativamente mais alto em comparação com animais tratados com veículo ($p < 0,05$, $n=4$ a 5, figura 5). Análise de coordenação motora pelo teste de tempo gasto em um rotarod revelou que camundongos pmn tratados com PEG-IGF-I executaram melhor do que camundongos tratados com veículo, significante no dia 38 pós-natal ($p < 0,05$, $n=8$ a 12, figura 6). Além disso, análise histológica foi realizada a partir de camundongos pmn tratados do dia 13 pós-natal com veículo ou PEG-IGF-I (150 $\mu\text{g/kg}$ s.c.) e perfundidos no dia 34 pós-natal. Contagem estereológica de motoneurônios faciais revelou um número significativamente mais alto de motoneurônios sobreviventes no grupo de tratamento com PEG-IGF-I ($p < 0,01$, $n=6$ a 12, figura 7). Similarmente, a sobrevivência de motoneurônios na medula espinhal lombar foi significativamente aumentada ($p < 0,001$, $n=5$ a 6, figura 8). Finalmente, análise do número de axônios mielinizados no nervo frênico revelou um número mais alto significativo de axônios mielinizados no nervo frênico proximal ($p < 0,05$, $n=4$ a 5, figura 9) bem como no distal ($p < 0,01$, $n=5$ a 6, figura 10) comparando camundongos pmn tratados com veículo contra PEG-IGF-I.

Para teste de PEG-IGF-I no modelo ainda mais largamente usado de ALS familiar, camundongos SOD1 (G93A) (baixa cópia) foram usados. Estes camundongos desenvolvem os primeiros sintomas da doença na semana 34 a 35 pós-natal e morte aproximadamente 4 a 5 semanas depois. Camundongos SOD1 (G93A), então, foram tratados duas vezes por semana (q3.5d) com veículo ($n=6$) ou 150 $\mu\text{g/kg}$ de PEG-IGF-I ($n=7$) s.c. na semana 34 pós-natal, isto é, no momento em que a doença apenas começou. Para assegurar o poder estatístico ao longo do curso do experimento, análise LOCF (última observação remanescente) foi realizada. Este método (também usado em testes clínicos) mantém a última medida de um animal antes da morte de todos os pontos de tempo subsequentes. Análise de modificações de peso corporal revelou que a redução do peso corporal na primeira

fase da doença (por volta da semana 37) foi significativamente retardada em camundongos tratados com PEG-IGF-I ($p < 0,05$ para semanas 37, 38 e 39, $n=6$ a 7 LOCF, figura 11). O início de doença em si como medido pelos primeiros sinais de fraqueza de membros anteriores, andaduras anormais e dificuldade de manter-se em uma rede de arame invertida foi retardado em média por 4 semanas da semana 38,5 pós-natal à semana 42,5 ($p < 0,05$, $n=6$ a 7, figura 12). Usando a estimativa semanal da força muscular dos membros dianteiros pela análise da força de aperto, um efeito protetor significativo de PEG-IGF-I foi observado da semana 35 pós-natal constantemente até a morte de todos os animais ($p < 0,05$ para semanas 35, 38, 42 e 43, $p < 0,01$ para semanas 36, 39, 40 e 41, $n=6$ a 7 LOCF, figura 13). Análise da coordenação motora pelo teste de tempo gasto em um rotarod revelou que camundongos SOD1 tratados com PEG-IGF-I (G93A) atuaram significativamente melhor do que camundongos tratados com veículo ($p < 0,05$ para semanas 37, 38, 39 e 41, $p < 0,01$ para semanas 40, 42 e 43, $n=6$ a 7 LOCF, figura 14).

Tomado todos os dados *in vivo* de camundongos pmn e SOD1 (G93A) em conjunto, os estudos mostraram que PEG-IGF-I interfere na função neuromuscular em modelos de ALS em todos os alvos relevantes e tem o potencial para atuar em todos os estágio da doença. Foi mostrado que PEG-IGF-I preserva a força e função muscular sugerindo um efeito anabólico sobre o músculo, ainda mais provavelmente pela proteção da junção e conectividade neuromuscular. Além disto, foi mostrado que PEG-IGF-I resgata axônios motores e corpos celulares de motoneurônio na medula espinal e núcleo facial sugerindo um efeito protetor direto sobre motoneurônios (figura 15). Como estas degenerações ocorrem em um estágio tardio de ALS, PEG-IGF-I pode provavelmente afetar o curso da doença tanto nos estágios precoces quanto tardios.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma variante polietilenoglicol-(PEG)ilada de IGF-I para a produção de uma composição farmacêutica para o tratamento, prevenção e/ou retardo de um distúrbio neuromuscular em que a dita variante polietilenoglicol-(PEG)ilada de IGF-I é caracterizada pelo fato de que é derivada da sequência de aminoácidos de IGF-I humano selvagem (SEQ ID NO: 1) e carrega uma ou duas alterações de aminoácidos nas posições de aminoácido 27, 65 e 68 para que um ou dois aminoácidos nas posições 27, 65 e 68 seja/sejam um aminoácido polar mas não lisina e PEG seja ligado a pelo menos um resíduo lisina.
2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, em que a dita variante PEGuilada de IGF-I apresenta as seguintes alterações de aminoácido da sequência de aminoácidos de IGF-I humano selvagem (SEQ ID NO: 1):
- (a) K65R e K68R (SEQ ID NO: 2)
 - (b) K27R e K68R (SEQ ID NO: 3), ou
 - (c) K27R e K65R (SEQ ID NO: 4).
3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a dita variante PEGuilada de IGF-I é mono-PEGuilada em K68 e caracterizada pelas seguintes alterações de aminoácido da sequência de aminoácidos de IGF-I humano selvagem (SEQ ID NO: 1):
- K27R e K65R (SEQ ID NO: 4).
4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o dito PEG tem um peso molecular total de 20 a 100 kDa.
5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a dita variante PEGuilada de IGF-I é adicionalmente PEGuilada no aminoácido N-terminal.
6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a dita variante PEGuilada de IGF-I é monoPEGuilada em K65 ou em K68, ou é diPEGuilada em K65 e K68.
7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a dita variante PEGuilada de IGF-I é caracterizada pelo fato de que três aminoácidos no N-terminal são truncados.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a dita variante PEGuilada de IGF-I é caracterizada pelo fato de que o grupo(s) poli(etilenoglicol) é/são grupo(s) poli(etilenoglicol) ramificado.

9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o dito distúrbio neuromuscular é uma doença de neurônio motor (MND).

10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, em que a dita MND é esclerose lateral amiotrófica (ALS).

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, em que a variante PEGuilada de IGF-I é usada separadamente, sequencialmente ou simultaneamente em uma combinação combinada com um segundo composto farmacologicamente ativo.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, em que o segundo composto farmacologicamente ativo da combinação é pelo menos um neuroprotetor tendo um efeito inibitório sobre a liberação de glutamato ou efeito de inativação de canais de sódio dependentes de voltagem ou a capacidade de interferir em eventos intracelulares que seguem a ligação do transmissor em receptores de aminoácidos excitatórios.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, em que o segundo composto farmacologicamente ativo é riluzol.

14. Método para o tratamento, prevenção e/ou retardo da progressão de um distúrbio neuromuscular em um indivíduo em necessidade de tal tratamento, que compreende administração ao dito indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um IGF-I PEGuilado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 em uma forma farmacêuticamente aceitável.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que o dito distúrbio neuromuscular é uma MND, preferencialmente ALS.

16. Composição farmacêutica compreendendo uma variante PEGuilada de IGF-I como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 em uma forma farmacêuticamente aceitável para o tratamento, prevenção e/ou retardo da progressão de um distúrbio neuromuscular.

17. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 16, em que o dito distúrbio neuromuscular é uma MND, preferencialmente ALS.

18. Invenção como descrita anteriormente.

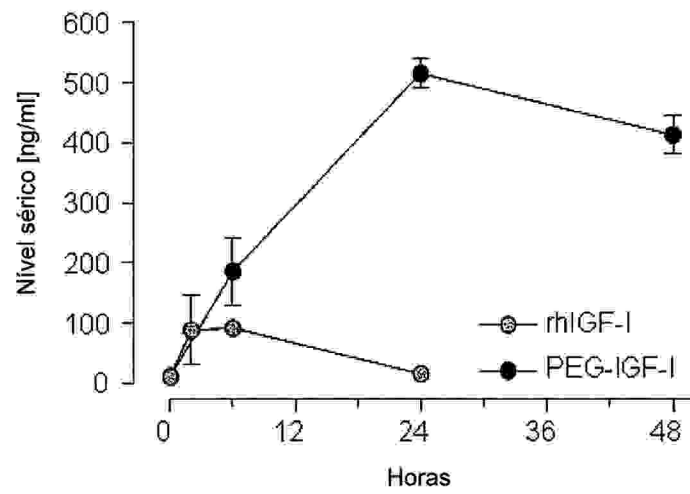


Fig. 1

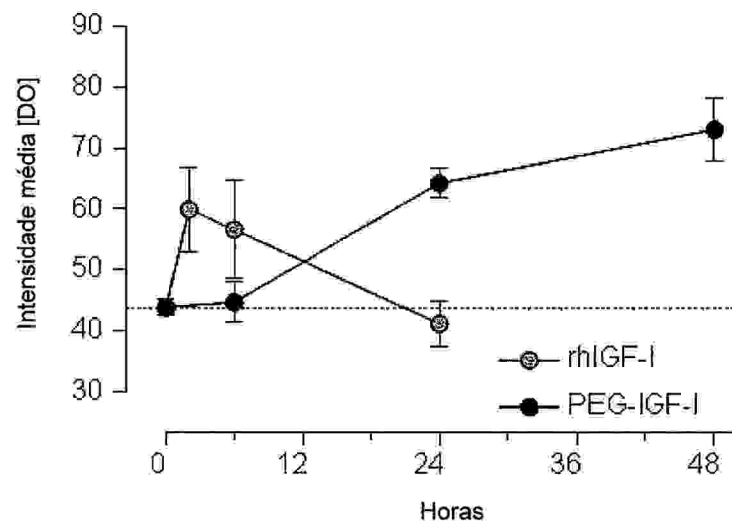


Fig. 2

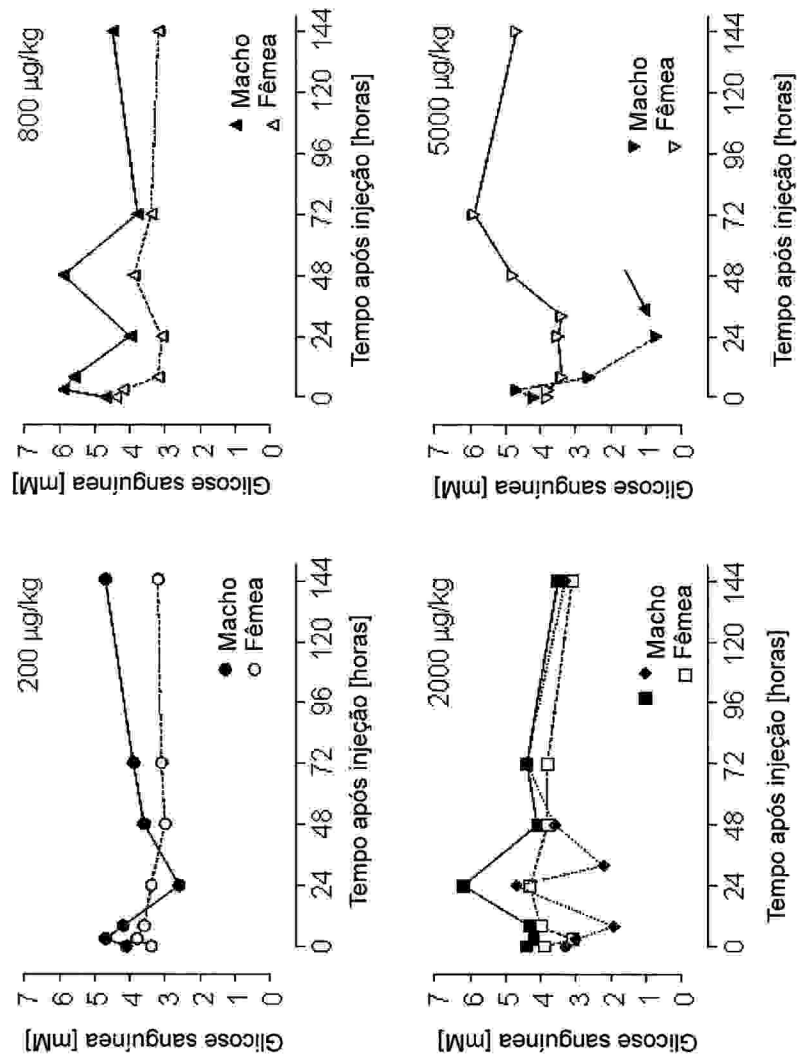


Fig. 3

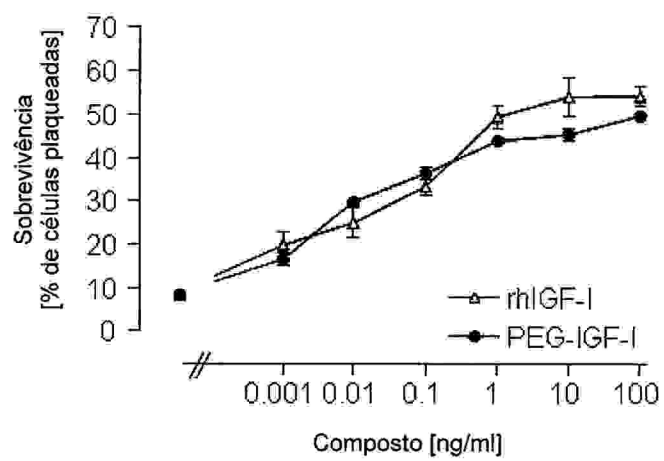


Fig. 4

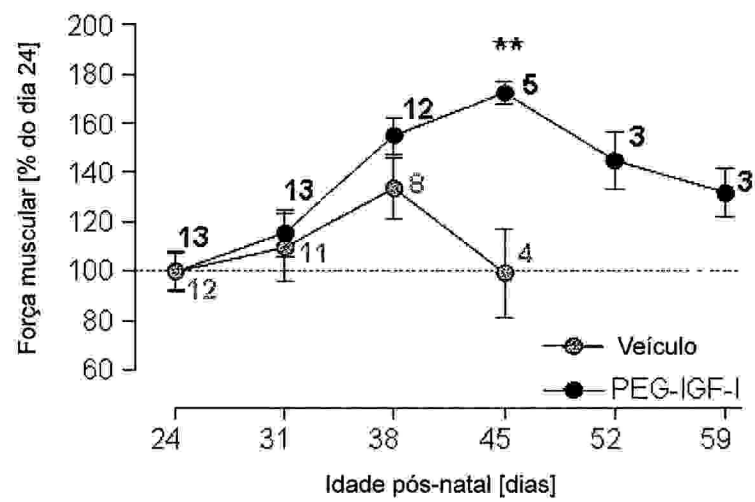


Fig. 5

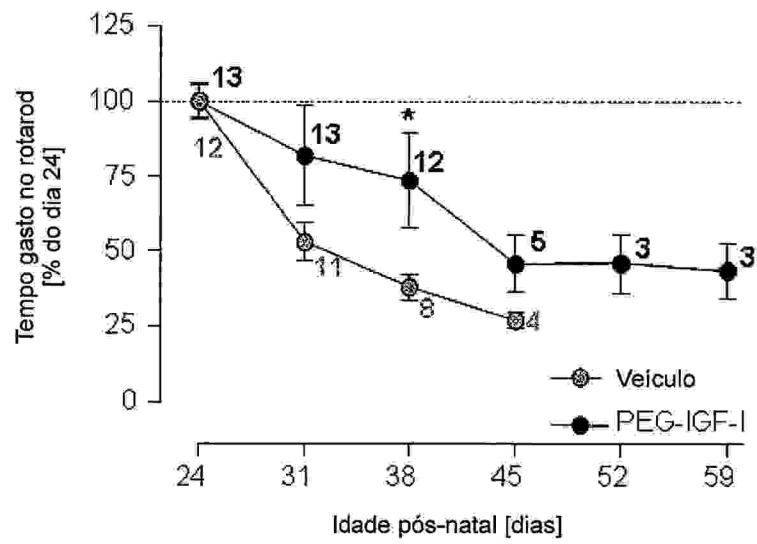
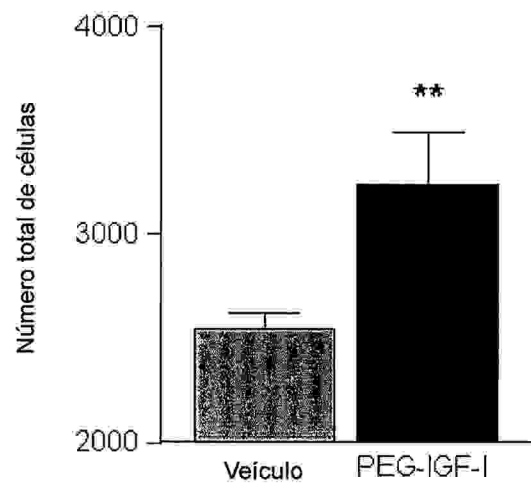


Fig. 6

**Fig. 7**

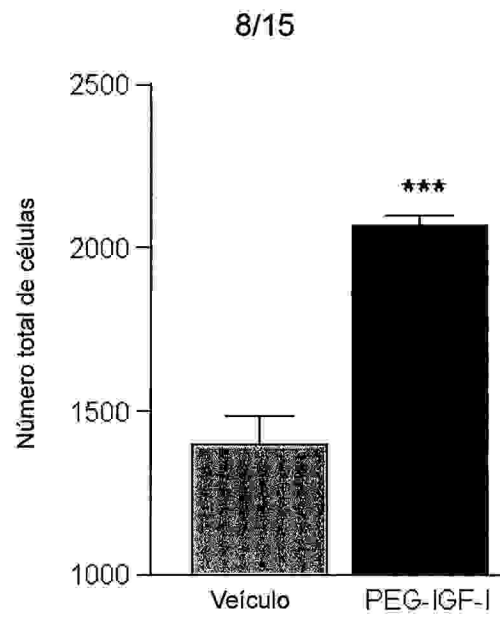


Fig. 8

9/15

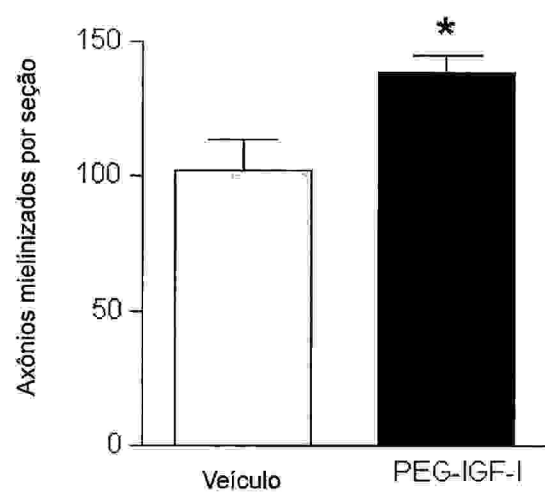


Fig. 9

10/15

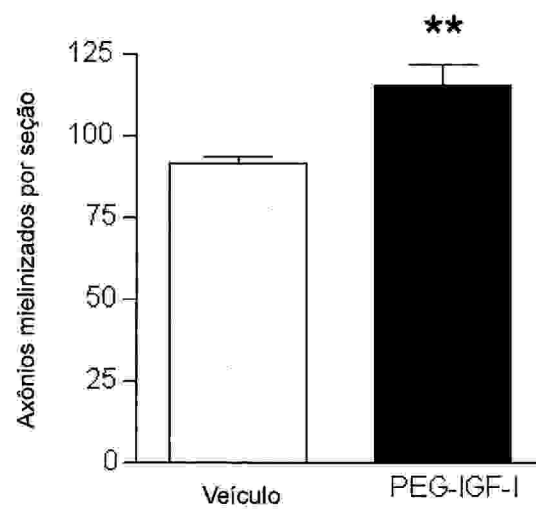


Fig. 10

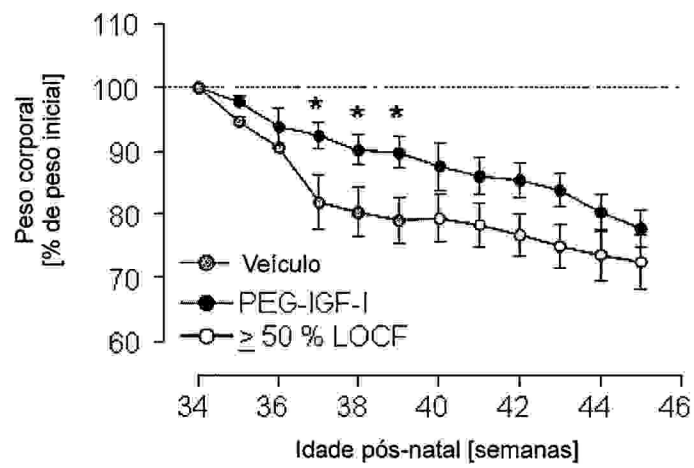


Fig. 11

12/15

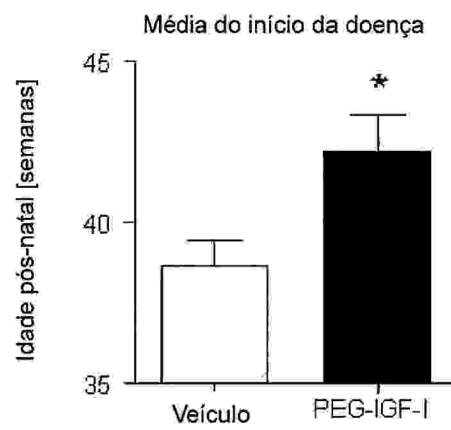
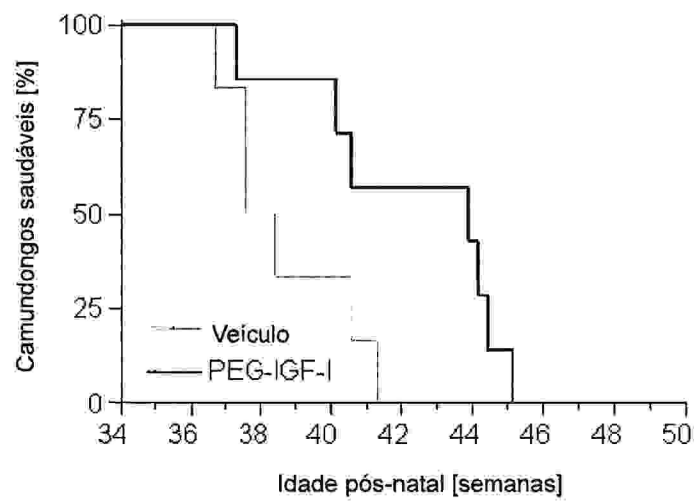


Fig. 12

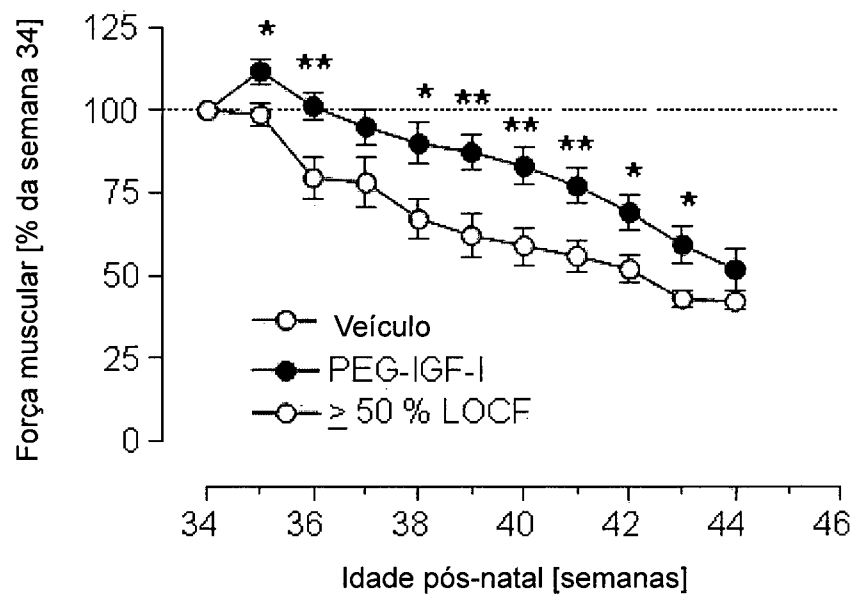


Fig. 13

14/15

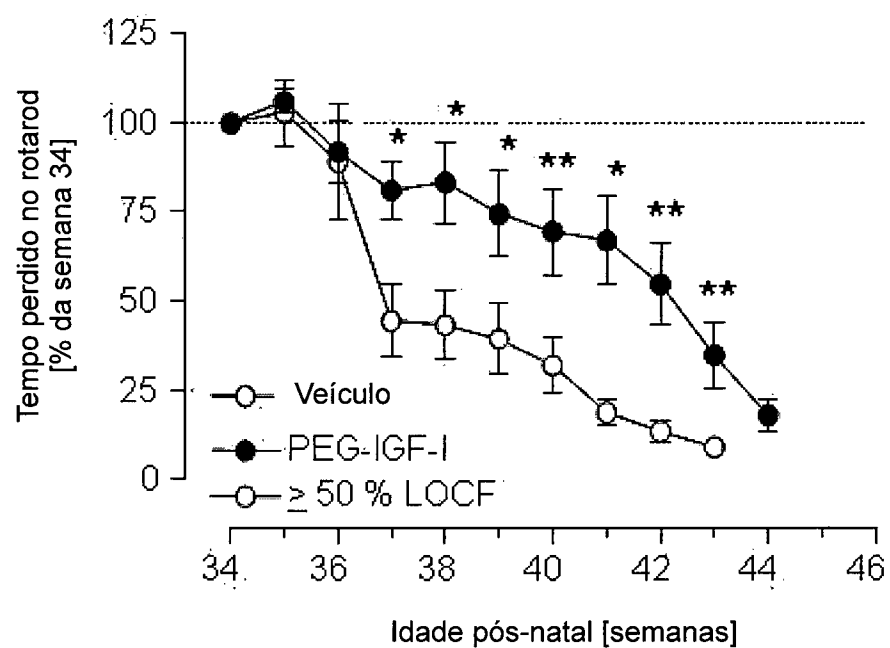


Fig. 14

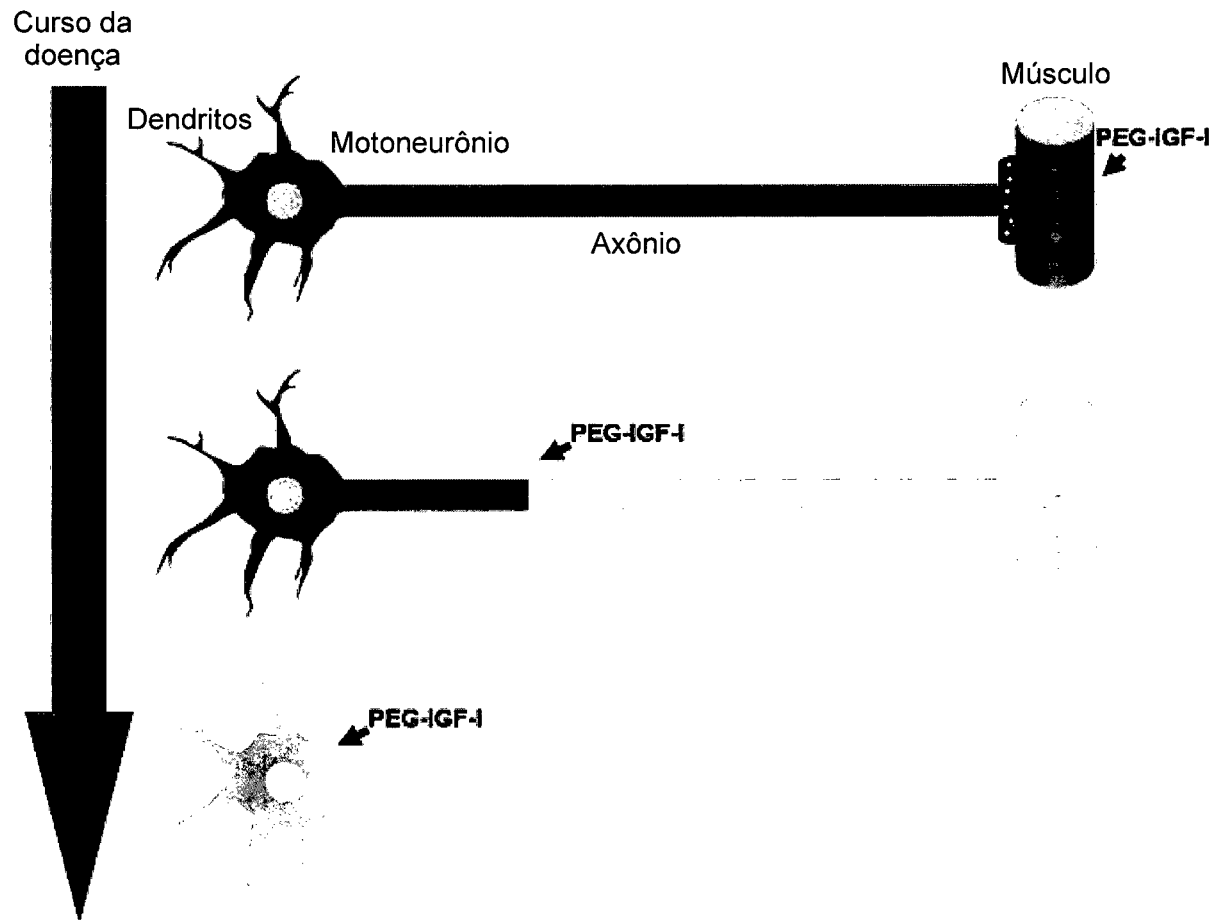


Fig. 15

RESUMO

Patente de Invenção: **"USO DE VARIANTES PEGUILADAS DE IGF-I PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS NEUROMUSCULARES"**.

A presente invenção refere-se ao uso farmacêutico de variantes polietilenoglicol-(PEG)uiladas de IGF-I para o tratamento, prevenção e/ou retardo da progressão de distúrbios neuromusculares, em particular esclerose lateral amiotrófica (ALS). Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao uso de uma variante PEGuilada de IGF-I para a produção de uma composição farmacêutica para o tratamento, prevenção e/ou retardo de distúrbios neuromusculares, em particular ALS em que a variante PEGuilada de IGF-I é caracterizada pelo fato de que é derivada da sequência de aminoácidos de IGF-I humano do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1) e carrega uma ou duas alterações de aminoácido nas posições de aminoácido 27, 65 e 68 para que um ou dois aminoácidos nas posições 27, 65 e 68 seja/sejam um aminoácido polar mas não lisina e PEG seja ligado a pelo menos um resíduo lisina.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



649D018A3FEE6E35

Campo 2



129D9CAFC6685D18

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P170033-list. seq.txt
- Data de Geração do Código: 30-09-2010
- Hora de Geração do Código: 13:33:17
- Código de Controle:
 - Campo 1: 649D018A3FEE6E35
 - Campo 2: 129D9CAFC6685D18