



INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) **Número de Publicação:** PT 686045 E

(51) **Classificação Internacional:** (Ed. 6 )  
A61K047/26 A A61K047/10 B  
A61K009/16 B

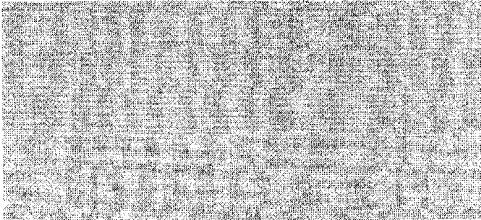
(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) <b>Data de depósito:</b> 1994.02.17	(73) <b>Titular(es):</b> GENENTECH, INC. 460 POINT SAN BRUNO BOULEVARD STH.S.FRANCISCO, CA 94080- 4990 US
(30) <b>Prioridade:</b> 1993.02.23 US 21421	
(43) <b>Data de publicação do pedido:</b> 1995.12.13	(72) <b>Inventor(es):</b> JEFFREY L. CLELAND ANDREW J.S. JONES US US
(45) <b>Data e BPI da concessão:</b> 2000.11.15	(74) <b>Mandatário(s):</b> ANTÔNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) **Epígrafe:** ESTABILIZAÇÃO POR EXCIPIENTES DE POLIPÉPTIDOS TRATADOS COM SOLVENTES ORGÂNICOS

(57) **Resumo:**

ESTABILIZAÇÃO POR EXCIPIENTES DE POLIPÉPTIDOS TRATADOS COM  
SOLVENTES ORGÂNICOS





## DESCRIÇÃO

### **“Estabilização por excipientes de polipéptidos tratados com solventes orgânicos”**

O presente invento refere-se à utilização de excipientes para estabilizar formulações tanto secas como aquosas de polipéptidos tratados com solventes orgânicos.

As preparações farmacêuticas de polipéptidos são sensíveis a desnaturação e degradação após formulação e armazenamento. Os polióis têm sido utilizados para estabilizar proteínas e outras macromoléculas em formulações aquosas e em secagem ao ar ou liofilização a partir de soluções aquosas.

Em U.S. Nº 4 297 344 divulga-se a estabilização dos factores de coagulação II e VIII, antitrombina III e plasminogénio contra o calor através da adição de aminoácidos seleccionados tais como glicina, alanina, hidroxiprolina, glutamina e ácido aminobutírico, e um hidrato de carbono tal como um monossacárido, um oligossacárido ou um alditol.

O Pedido de Patente Europeia, Publicação Nº 0 303 746 divulga a estabilização de hormonas promotoras do crescimento com polióis consistindo em açúcares não redutores, aldítóis, ácidos derivados de açúcares, pentaeritritol, lactose, dextrans solúveis em água e Ficoll, aminoácidos, polímeros de aminoácidos possuindo um grupo lateral carregado a pH fisiológico e sais de colina.

O Pedido de Patente Europeia, Publicação Nº 0 193 917 divulga uma composição biologicamente activa para libertação lenta caracterizada por uma solução aquosa de um complexo entre uma proteína e um hidrato de carbono.

O Pedido de Patente Australiana Nº AU-A-30771/89 divulga a estabilização de hormona do crescimento utilizando glicina e manitol.

Em U.S. Nº 5 096 885 divulga-se uma formulação de hGH para liofilização contendo glicina, manitol, um tensioactivo não iónico e um tampão.

A utilização de polietilenoglicóis para estabilizar proteínas é revista em Pharm. Res. 8: 285-291, 1991.



Exemplos da utilização de tre-halose e outros polióis para a estabilização de proteínas durante secagem em sistemas aquosos incluem os seguintes.

Em U.S. Nº 4 891 319 divulga-se a conservação de proteínas sensíveis e outras macromoléculas em sistemas aquosos através de secagem a temperaturas ambientes e à pressão atmosférica na presença de tre-halose.

Em U.S. Nº 5 149 653 divulga-se um método de conservação de vírus vivos num sistema aquoso através de secagem num estado congelado ou à temperatura ambiente, na presença de tre-halose.

Os polióis têm também sido utilizados para estabilizar formulações secas de fármacos como, por exemplo, em WO 8903671, apresentado em 5 de Maio de 1989, o qual divulga a adição de um estabilizante tal como uma gelatina, albumina, dextrano ou tre-halose a uma mistura de um fármaco em pó fino suspenso num meio oleoso.

O tratamento de um polipéptido com um solvente orgânico tal como cloreto de metíleno coloca o problema de desnaturação do polipéptido de interesse. Assim, é um objectivo do presente invento proporcionar um método para estabilizar polipéptidos em formulações aquosas tratadas com solventes orgânicos.

É outro objectivo do presente invento estabilizar polipéptidos secos tratados com solventes orgânicos.

É outro objectivo do presente invento proporcionar um método para estabilização de polipéptidos encapsulados.

É outro objectivo do presente invento proporcionar um polipéptido estabilizado por um excipiente para utilização numa formulação de libertação controlada, em que o polipéptido é tratado com um solvente orgânico.

Em EP-A-0 251 476 divulga-se um sistema de entrega de agentes activos para a administração controlada de polipéptidos macromoleculares que compreende uma microssuspensão de componentes solúveis em água numa matriz de polilactido. Como exemplo são apresentados uma microssuspensão de HuIFN- $\beta$ , HSA e dextrose numa solução de polilactido em acetona e uma emulsão



de uma solução aquosa de HIFN- $\beta$ , HSA e dextrose e polilactido dissolvidos em dicloreto de metíleno, e dispositivos de libertação controlada feitos a partir destes.

Em EP-A-0 256 726 divulga-se uma microcápsula contendo TRH, um seu análogo ou um seu sal e um método de produção da mesma, a qual consegue a libertação do ingrediente activo de forma estável durante um período de tempo prolongado com elevadas taxas de incorporação do ingrediente activo no seu interior e com pouca possibilidade de libertação inicial excessiva ou rebentamento.

Em WO87/05300 divulga-se um processo para conservação de um material possuindo uma estrutura dependente da água compreendendo o contacto do material com uma solução aquosa de um composto poli-hidroxi removendo depois a água do material. Um composto poli-hidroxi preferido é a tre-halose.

Um aspecto do presente invento consiste um método de estabilização de um polipéptido contra desnaturação quando tratado com um solvente orgânico, em que o método compreende a mistura do polipéptido com tre-halose.

Outro aspecto do presente invento consiste um método de formulação de um polipéptido compreendendo

- a) mistura do polipéptido numa solução aquosa com tre-halose; e
- b) tratamento do polipéptido na solução aquosa com um solvente orgânico.

Outro aspecto do presente invento consiste um método de formulação de um polipéptido seco para libertação controlada compreendendo

- a) mistura do polipéptido com um excipiente, em que o referido excipiente é tre-halose; e
- b) tratamento do produto do passo a) com um solvente orgânico.

Outro aspecto do presente invento consiste uma composição para libertação controlada de um polipéptido compreendendo um polipéptido misturado com um excipiente, sendo o excipiente tre-halose, em que o polipéptido misturado com o excipiente é tratado com um solvente orgânico e é encapsulado numa matriz polimérica.



## DESCRÍÇÃO DETALHADA DO INVENTO

### A. DEFINIÇÕES

O termo "poliol" tal como aqui se utiliza denota um hidrato de carbono incluindo pelo menos dois hidroxilos ligados a átomos de carbono. Os polióis podem incluir outros grupos funcionais. Exemplos de polióis incluem aldítóis tais como manitol e tre-halose, e poliéteres.

O termo "poliéter", tal como aqui se utiliza, denota um hidrato de carbono contendo pelo menos três ligações éter. Os poliéteres podem incluir outros grupos funcionais. Os poliéteres incluem polietilenoglicol (PEG).

O termo "polipéptido seco", tal como aqui se utiliza, denota um polipéptido que foi sujeito a um procedimento de secagem tal como liofilização de tal forma que tenha sido removida pelo menos 50% da humidade.

O termo "encapsulação", tal como aqui se utiliza, denota um método para formulação de um agente terapêutico, tal como um polipéptido, numa composição útil para libertação controlada do agente terapêutico. Os exemplos de materiais de encapsulação úteis no presente invento incluem polímeros ou copolímeros dos ácidos láctico e glicólico, ou misturas de tais polímeros e/ou copolímeros, vulgarmente referidos como "polilactídios".

O termo "mistura", tal como aqui se utiliza, denota a adição de um excipiente a um polipéptido de interesse, tal como a mistura de reagentes secos ou a mistura de um reagente seco com um reagente em solução ou suspensão, ou a mistura de formulações aquosas de reagentes.

O termo "excipiente", tal como aqui se utiliza, denota um agente não terapêutico adicionado a uma composição farmacêutica para proporcionar uma consistência desejada ou efeito estabilizante.

Pretende-se que o termo "solvente orgânico" tal como aqui se utiliza signifique qualquer solvente contendo compostos de carbono. Os exemplos de solventes orgânicos incluem cloreto de metileno, acetato de etilo, dimetilsulfóxido, tetra-hidrofurano, dimetilformamida e etanol.

O "tratamento" de um polipéptido com um solvente orgânico, tal como aqui se utiliza, refere-se à mistura de um polipéptido seco com um solvente orgânico, ou



à produção de uma emulsão de um polipéptido numa formulação aquosa com um solvente orgânico, criando uma interface entre um polipéptido numa formulação aquosa com um solvente orgânico, ou extraíndo um polipéptido de uma formulação aquosa com um solvente orgânico.

"Polipéptido" tal como aqui se utiliza refere-se genericamente a péptidos e proteínas possuindo mais de cerca de 10 aminoácidos.

#### B. MÉTODOS GERAIS

Em geral, os polipéptidos, tanto em formulações aquosas como secos, podem ser misturados com um excipiente para proporcionar um efeito estabilizante antes do tratamento com um solvente orgânico. Uma formulação aquosa de um polipéptido pode ser um polipéptido em suspensão ou em solução. Tipicamente será adicionada uma formulação aquosa do excipiente a uma formulação aquosa do polipéptido, embora possa ser adicionado um excipiente seco e vice versa. Uma formulação aquosa de um polipéptido e um excipiente pode também ser seca através de liofilização ou outros meios. Tais formulações secas podem ser reconstituídas em formulações aquosas antes do tratamento com um solvente orgânico.

Tipicamente, a razão em massa de tre-halose para polipéptido será de 100:1 a 1:100, de preferência 1:1 a 1:10, sendo preferível 1:3 a 1:4. As razões óptimas são escolhidas com base numa concentração de excipiente que permita uma solubilidade máxima do polipéptido com uma desnaturação mínima do polipéptido.

As formulações do presente invento podem conter um conservante, um tampão ou tampões, múltiplos excipientes, tais como polietilenoglicol (PEG) para além de tre-halose ou um tensioactivo não iónico tal como o tensioactivo Tween. Os tensioactivos não iónicos incluem um polissorbato, tal como o polissorbato 20 ou 80, etc., e os poloxâmeros, tais como o poloxâmero 184 ou 188, polióis Plurónicos, 80, etc., e outros polímeros de blocos de etileno/polipropileno, etc. Serão utilizadas quantidades eficazes para proporcionar uma formulação aquosa estável, normalmente na gama de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 30% (p/v).

Os tampões incluem tampões de fosfato, Tris, citrato, succinato, acetato ou histidina. Com grande vantagem, o tampão está na gama de cerca de 2 mM a cerca de 100 mM. Os tampões preferidos incluem os tampões succinato de sódio e fosfato de potássio.



Os conservantes incluem fenol, álcool benzílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloreto de benzalcônio e cloreto de benzetônio. Os conservantes preferidos são fenol 0,2-0,4% (p/v) e álcool benzílico 0,7-1% (p/v), embora o tipo de conservante e a gama de concentrações não sejam críticos.

Em geral, as formulações do presente invento podem conter outros componentes em quantidades não prejudiciais na preparação de formas estáveis e em quantidades adequadas para uma administração farmacêutica eficaz e segura. Por exemplo, outros excipientes farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos dos peritos na arte podem fazer parte das presentes composições. Estes incluem, por exemplo, vários agentes avolumantes, agentes de tamponamento adicionais, agentes quelantes, antioxidantes, co-solventes e semelhantes; exemplos específicos destes podem incluir sais de tri-hidroximetilamina ("tampão Tris") e edetato dissódico.

Os polipéptidos de interesse incluem polipéptidos glicosilados e não glicosilados, tais como uma hormona do crescimento, os interferões e proteínas virais tais como protease de HIV e gp120.

O polipéptido estabilizado do presente invento pode ser formulado para libertação sustentada, especialmente porque a exposição a solventes orgânicos é um passo vulgar em muitas dessas preparações. Os exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrófobos sólidos contendo o polipéptido, matrizes essas que estão na forma de artigos conformados, p.ex. películas ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogeles [p.ex. poli(2-hidroxietilmacrilato) tal como descrito por Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981) e Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982) ou poli(álcool vinílico)], polilactídios (Pat. U.S. Nº 3773919, EP 58 481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato [Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)], etileno-acetato de vinilo não degradável (Langer *et al.*, *supra*), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tais como Lupron Depot<sup>TM</sup> (microesferas injectáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolidio) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133988). Enquanto que polímeros tais como etileno-acetato de vinilo e ácido láctico-ácido glicólico permitem a libertação de moléculas durante mais de 100 dias, certos hidrogeles libertam polipéptidos durante períodos de tempo mais curtos. Quando os polipéptidos encapsulados permanecem no corpo durante muito tempo, podem desnaturar ou agregar-se em resultado de exposição à humidade a 37°C,



resultando numa perda de actividade biológica e possíveis alterações na imunogenicidade. Podem ser concebidas estratégias racionais para estabilização de polipéptidos dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se se verificar que o mecanismo de agregação é a formação de ligações S-S intramoleculares através de intercâmbio tio-dissulfureto, a estabilização pode ser alcançada modificando resíduos sulfidrilo, liofilizando a partir de soluções ácidas, controlando o teor de humidade, utilizando aditivos apropriados e desenvolvendo composições de matrizes poliméricas específicas.

As composições de análogos de ligandos ou de anticorpos de libertação sustentada incluem também polipéptidos aprisionados em lipossomas. Os lipossomas contendo polipéptidos são preparados através de métodos conhecidos *per si*: DE 3218121; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 143949; EP 142641; pedido de patente Japonesa 83-118008; Pat. U.S. Nº 4485045 e Pat. U.S. Nº 4544545; e EP 102324. Vulgarmente, os lipossomas são do tipo pequeno (cerca de 200-800 Angstrom) unilamelares, em que o teor lipídico é superior a cerca de 30% mol. de colesterol, sendo a proporção seleccionada ajustada para uma terapia óptima com análogos de ligandos. São divulgados em Pat. U.S. Nº 5 013 556 lipossomas com um tempo de circulação aumentado.

#### EXEMPLOS EXPERIMENTAIS

##### EXEMPLO I.

###### Estabilização de Formulações Aquosas

Foram formuladas hormona de crescimento humana recombinante (hGH) e interferão gama humano recombinante (hIFN- $\gamma$ ) com vários excipientes para análise dos efeitos dos excipientes na estabilização no solvente orgânico, cloreto de metíleno. As formulações ótimas foram geralmente as que produziam a concentração máxima de polipéptido solúvel e a maior recuperação de polipéptido nativo após tratamento com cloreto de metíleno. A solubilidade máxima de hGH em cada uma das soluções foi determinada através da adição contínua de hGH liofilizada em tampão bicarbonato de amónio à solução e o limite de solubilidade foi definido como a concentração à qual a adição de polipéptido resultava em precipitação. A solubilidade máxima de hIFN- $\gamma$  foi medida adicionando uma solução-mãe concentrada (264 mg/ml de hIFN- $\gamma$ , succinato de Na 10 mM, pH 5) a



soluções concentradas de excipiente. O limite de solubilidade aparente de hIFN- $\gamma$  não foi observado para qualquer uma das formulações nestas condições, mas o armazenamento a longo prazo da solução-mãe resultou em precipitação como resultado de um aumento do pH (solução final, pH 6). Ambas as formulações de polipéptido foram testadas quanto à estabilidade em cloreto de metíleno através da adição de 100  $\mu$ l da solução de polipéptido a 1 ml de cloreto de metíleno. A mistura foi então submetida a ultra-sons durante 30 s. Após a aplicação de ultra-sons, o polipéptido foi extraído da fase orgânica por diluição em 50 ml de tampão isento de excipiente (tampão fosfato 50 mM, pH 8 para hGH; tampão succinato 10 mM, pH 5 para hIFN- $\gamma$ ). A quantidade de polipéptido solúvel recuperada foi determinada através de medições de absorvância de ultravioleta e a quantidade de polipéptido monomérico foi ensaiada por cromatografia de exclusão por tamanhos.

Ambos os polipéptidos foram testados quanto à estabilidade com tre-halose, manitol, carboximetilcelulose (CMC), tensioactivo Tween 20, dextrano, gelatina e polietilenoglicol. Estudos anteriores com hGH indicaram que formulações contendo uma razão em massa idêntica de polipéptido e manitol estabilizavam o polipéptido quanto a desnaturação e proporcionavam uma concentração máxima de polipéptido solúvel de 200 mg/ml (fosfato 100 mM, 200 mg/ml de manitol, pH 8). As formulações de tre-halose contendo razões de massas de excipiente para polipéptido de 1:4 e 1:3 originaram as concentrações mais altas de polipéptido solúvel, 400 mg/ml e 300 mg/ml, respectivamente. Adicionalmente, quando o polipéptido liofilizado nestas formulações foi tratado com cloreto de metíleno, foi alcançada uma recuperação completa de hGH monomérica solúvel. As formulações de hGH contendo manitol ou manitol com PEG, resultaram numa recuperação semelhante de hGH monomérica, mas a razão em massa (excipiente/polipéptido) necessária para evitar desnaturação foi superior à das formulações de tre-halose (manitol: 1:1; manitol/PEG: 1:1 ou 1:2; tre-halose: 1:3 ou 1:4) (Tabela I). Portanto, a tre-halose proporcionou uma elevada solubilidade de hGH e protecção contra a desnaturação em cloreto de metíleno numa concentração em massa inferior. Na ausência de excipientes, a solubilidade de hGH era muito inferior (cerca de 106 mg/ml) e o polipéptido era mais susceptível a desnaturação.



Tabela I

Teste de cloreto de metileno de formulações aquosas de hGH		
Formulação <sup>a</sup>	Monómero Solúvel Recuperado <sup>b</sup> (mg/ml)	Solubilidade Máxima <sup>c</sup> (mg/ml)
PEG (PM 3350) 100 mg/ml	12,2	96,4
PEG 50 mg/ml	34,7	89,6
PEG 10 mg/ml	37,2	128,3
Manitol 100 mg/ml	66,0	98,0
Manitol 50 mg/ml	46,2	106
Manitol 10 mg/ml	56,0	106
Dextrano 70 100 mg/ml	34,6	112,6
Dextrano 70 50 mg/ml	64,6	146,1
Dextrano 70 10 mg/ml	38,4	167,1
CMC a 2%	44,7	91,9
Tre-halose 100 mg/ml	113,9	267,3
Tre-halose 50 mg/ml	82,8	275
Tre-halose 10 mg/ml	92,0	267,3
PEG (PM 3350) 4 mg/ml, Manitol 96 mg/ml	102,6	243,7
PEG (PM 3350) 10 mg/ml, Manitol 90 mg/ml	104,0	184
PEG (PM 3350) 20 mg/ml, Manitol 80 mg/ml	139,9	240
Gelatina a 2%	21,9	70,5
PEG (PM 1000) 100 mg/ml	69,2	131,5
PEG 50 mg/ml	84,3	246,5
PEG 10 mg/ml	126,5	226,3
PEG (PM 1000) 4 mg/ml, Tre-halose 96 mg/ml	122,3	230,3
PEG (PM 1000) 10 mg/ml, Tre-halose 90 mg/ml	58,4	218,7
PEG (PM 1000) 20 mg/ml, Tre-halose 80 mg/ml	75,3	207,5
Sem excipiente	65,0	106,3

<sup>a</sup>Todas as soluções continham NaPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 8.

<sup>b</sup>Polipéptido extraído de cloreto de metileno (fracção do total) tal como determinado por absorvância a 278 nm multiplicada pela fracção de monómero recuperada a partir de SEC-HPLC. Polipéptido tratado à solubilidade máxima.

<sup>c</sup>A solubilidade máxima foi definida como a quantidade máxima de hGH não formulada que se dissolia em cada tampão.

Para estudos com hIFN- $\gamma$ , tanto o manitol como a tre-halose foram os melhores excipientes testados. Quando o manitol foi utilizado numa razão em massa (excipiente/polipéptido) de 1:3, a quantidade de dímero solúvel em solução (tal como determinada por cromatografia de exclusão por tamanho) após tratamento com cloreto de metileno era equivalente à quantidade no material de partida. No entanto, as formulações de manitol originaram uma recuperação de



menos de 60% do polipéptido solúvel total. Em contraste, a formulação de tre-halose com uma razão em massa de 1:2,5 originou uma recuperação de 80% do polipéptido solúvel total e a mesma fracção de dímero solúvel (tal como determinada por cromatografia de exclusão por tamanhos, designada SEC-HPLC nativa) que no material de partida (Tabela II). As formulações de polipéptido isentas de excipiente tratadas com cloreto de metileno retiveram 10% do dímero solúvel inicial (tal como determinado por SEC-HPLC nativa) após tratamento com cloreto de metileno e a recuperação de polipéptido solúvel total foi inferior a 60%. Quando ensaiadas por cromatografia de exclusão por tamanhos em NaPO<sub>4</sub> 0,2 M/SDS a 0,1% a pH 6,8 (denominada SDS SEC-HPLC), todas as formulações tinham mais de 99% de monómero antes e depois do tratamento com cloreto de metileno.

Para ambos os polipéptidos, foi observada uma recuperação drasticamente mais baixa de polipéptido monomérico após tratamento com cloreto de metileno para todas as formulações contendo tensioactivo Tween 20. Embora não tenham sido estudados outros tensioactivos, é provável que moléculas hidrófobas tais como o tensioactivo Tween 20 estabilizem os polipéptidos desnaturados enquanto que açúcares tais como manitol e tre-halose estabilizam o polipéptido nativo.

Tabela II

Teste de cloreto de metileno de formulações aquosas de hIFN- $\gamma$			
Formulação <sup>a</sup>	% de Polipéptido Solúvel Recuperado <sup>b</sup>	% de Dímero Intacto <sup>c</sup>	Dímero Solúvel <sup>d</sup>
Tween 20 a 0,01%	36,1	49,0	11,1
Tween 20 a 0,01% Manitol 62 mg/ml	59,0	69,0	25,6
Manitol 5 mg/ml	58,3	72,7	56,8
Manitol 50 mg/ml	62,9	83,4	70,3
Tre-halose 5 mg/ml	117	34,2	53,6
Tre-halose 50 mg/ml	75,6	61,3	62,1
CMC a 1%	78,2	62,5	65,5
Sem excipiente	51,6	6,0	7,9

<sup>a</sup>Todas as soluções com excipiente continham 134 mg/ml de hIFN- $\gamma$ , succinato de sódio 10 mM, pH 5; a formulação "sem excipiente" continha 256,3 mg/ml de proteína, succinato de sódio 10 mM, pH 5,0.

<sup>b</sup>Polipéptido extraído de cloreto de metileno (fracção do total) tal como determinado por absorvância a 280 nm.

<sup>c</sup>Quantidade de dímero intacto medida através do método de SEC-HPLC nativa. Todas as formulações originaram >99% de monómero quando ensaiadas através do método de SEC-HPLC SDS.

<sup>d</sup>Concentração de dímero solúvel (mg/ml) com base na quantidade de polipéptido solúvel recuperado e na fracção de dímero (método de SEC-HPLC nativa).

<sup>e</sup>A concentração de polipéptido nestas formulações era de 62,8 mg/ml.



## EXEMPLO II

### Estabilização de Formulações Secas e Aquosas para Encapsulação

No desenvolvimento de uma formulação de acção prolongada para a hormona de crescimento humana recombinante foi investigada a utilização de uma matriz polimérica biodegradável para libertação sustentada de hGH. O polímero utilizado para esta aplicação foi um copolímero dos ácidos láctico e glicólico que é frequentemente referido como poli(ácido láctico/glicólico) ou PLGA. Para incorporar hGH neste polímero, o PLGA tem de ser dissolvido num solvente imiscível em água. O solvente mais vulgarmente utilizado para dissolução de PLGA tem sido cloreto de metileno o qual proporciona tanto imiscibilidade em água como solubilidade de PLGA.

Em geral, para a produção de microesferas de hGH-PLGA, o polipéptido foi adicionado a uma solução de cloreto de metileno contendo PLGA. Em estudos iniciais, o polipéptido foi adicionado na forma de um pó liofilizado triturado. Após a adição de polipéptido, a solução de cloreto de metileno foi então brevemente homogeneizada e a solução foi adicionada a um banho de emulsão. Este processo resultou na extração de cloreto de metileno com a formação concomitante de microesferas de PLGA contendo hGH. O polipéptido libertado por estas microesferas foi então estudado para determinar a integridade da hGH após incorporação nas microesferas. A avaliação da hGH libertada foi efectuada por cromatografia de exclusão por tamanhos analítica (SEC-HPLC) bem como por outras técnicas. A cromatografia de exclusão por tamanhos indicou que a hGH era libertada das microesferas de PLGA na forma de monómero nativo, agregados e de uma estrutura desconhecida que eluia entre o monómero e o dímero. A estrutura desconhecida do polipéptido foi extensivamente estudada e mostrou-se ser uma variante conformacional de hGH. Adicionalmente, os mesmos agregados e variante conformacional podem ser obtidos através de tratamento de hGH com cloreto de metileno. Assim, a utilização de cloreto de metileno no processo pode causar desnaturação e agregação de hGH.

A libertação de hGH nativa monomérica das microesferas de PLGA é necessária para uma formulação de acção prolongada bem sucedida. Estudos anteriores investigaram vários solventes orgânicos como alternativas ao cloreto de metileno. Esta investigação indicou que a hGH era susceptível a danos por vários solventes orgânicos. Uma vez que o cloreto de metileno proporcionava as propriedades de solvente desejadas (i.e. imiscibilidade com água, dissolução de



PLGA, etc.) para a produção de microesferas de PLGA e os outros solventes não melhoravam significativamente a estabilidade da hGH, foi escolhido o cloreto de metileno para a produção das microesferas de PLGA. O polipéptido utilizado para o estudo de solventes e no processo de produção de PLGA foi formulado e liofilizado em tampão de bicarbonato de amónio a pH 7. Portanto, este estudo foi efectuado para desenvolver formulações que estabilizariam hGH durante a produção das microesferas de PLGA.

#### A. Métodos

##### 1. Preparação de Formulações de hGH

Para o desenvolvimento de uma formulação estável de cloreto de metileno, a hGH liofilizada em bicarbonato de amónio foi reconstituída no tampão desejado e deixou-se dissolver. O polipéptido não dissolvido foi removido por centrifugação a 13000 rpm durante 1 min.

Para cada liofilização, indicada abaixo, a concentração de hGH foi de 10 mg/ml. A humidade residual destas formulações não foi determinada, mas foi utilizado o mesmo ciclo de liofilização em cada um dos casos.

A trituração da proteína liofilizada foi efectuada com um moinho de impacção a pressão e resultou num particulado fino de hGH.

##### 2. Teste de Cloreto de Metileno de Formulações de hGH

O efeito do cloreto de metileno na estabilidade de hGH foi determinado através da adição de hGH a uma solução de cloreto de metileno. Para condições de hGH sólida, a razão em massa de polipéptido (mg) para volume de solvente orgânico (ml) foi de 40 mg/ml. Para as condições de hGH aquosa, foram adicionados 100 µl de hGH numa solução tamponada a 1,0 ml de cloreto de metileno para avaliar os efeitos de cada sistema tampão na estabilização de hGH em cloreto de metileno. Após a adição de polipéptido, as amostras foram submetidas a ultra-sons durante 30 segundos num banho de ultra-sons de 47 kHz (Cole Parmer, Modelo 08849-00) para estimular o passo de homogeneização no processo de produção de microesferas. Se a formulação estabilizava hGH contra desnaturação neste teste, era ainda avaliada através de homogeneização em cloreto de metileno. Após a aplicação de ultra-sons ou homogeneização, o polipéptido foi extraído do cloreto de metileno através de diluição num excesso de 50 vezes de NaHPO<sub>4</sub> 5 mM, pH 8. A quantidade e qualidade do polipéptido extraído neste passo foram determinadas através de medições da concentração de



polipéptido (absorvância a 278 nm) e por HPLC de exclusão por tamanhos (SEC-HPLC). A formulação estável preferida foi a que originou a recuperação máxima de polipéptido monomérico sem a formação de variantes conformacionais ou agregados maiores que dímeros.

#### B. Resultados

##### 1. Estudos de Excipientes de Estabilização de hGH

Estudos iniciais de hGH liofilizada em bicarbonato de amónio investigaram a solubilidade do polipéptido em diferentes tampões a várias condições de pH. A partir destes estudos, foi determinado que hGH tinha a estabilidade e solubilidade máximas em tampão fosfato (5-10 mM) a pH 8, e assim foram efectuados estudos adicionais com hGH neste tampão.

Tentativas iniciais para evitar agregação de hGH utilizaram tensioactivo Tween 80 no tampão de formulação. Tal como mostrado na Tabela III, o teste de cloreto de metileno destas formulações aquosas indicou que concentrações baixas de tensioactivo Tween (tensioactivo Tween 80 a 0,1%) com 10 mg/ml de manitol proporcionavam uma boa recuperação de polipéptido monomérico solúvel. No entanto, os melhores resultados nesta experiência foram obtidos para hGH que foi formulada em 10 mg/ml de manitol, sem tensioactivo Tween 80 (NaHPO<sub>4</sub> 5 mM, pH 8). Concentrações mais elevadas de tensioactivo Tween no tampão de formulação resultaram em agregação aumentada e recuperação diminuída de polipéptido solúvel. Para cada um dos casos mostrados na Tabela III, as formulações proporcionaram maior estabilização de hGH que do polipéptido triturado que foi liofilizado em bicarbonato de amónio.

(Segue Tabela)



Tabela III

Formulação <sup>a</sup>	% de Polipéptido <sup>b</sup> Recuperado	% de Área <sup>c</sup> de Recuperação	Polipéptido Solúvel (Fracção em Massa do Total)			
			% de Trímero	% de Dímero	% de Intermediário	% de Monómero
Tween 80 a 1%	85,7	90,0	0,5	3,4	1,1	94,9
Tween 80 a 0,1%	70,9	98,3	2,0	3,6	1,8	92,6
Tween 80 a 1% Manitol 10 mg/ml	65,0	97,8	3,3	3,4	3,4	90,0
Tween 80 a 0,1% Manitol 10 mg/ml	70,9	98,3	0,0	2,2	0,0	97,8
PEG (PM 3350) 10 mg/ml	97,6	101,1	0,0	2,6	0,0	97,4
PEG 10 mg/ml Manitol 10 mg/ml	76,4	97,7	1,7	2,8	1,6	93,9
NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 8	55,3	99,4	0,0	3,2	0,0	96,8
NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 8 Manitol 10 mg/ml	91,7	99,8	0,0	1,8	0,0	98,2

<sup>a</sup>Todas as soluções contêm NaPO<sub>4</sub> 5 mM, pH 8

<sup>b</sup>Polipéptido extraído de cloreto de metileno (fracção do total) tal como determinado por absorvância a 278 nm.

<sup>c</sup>Resultados de SEC-HPLC para polipéptido extraído para tampão após tratamento com cloreto de metileno.

Os testes de cloreto de metileno de formulações sólidas de hGH são mostrados na Tabela IV. Estes resultados indicaram que a formulação que melhor estabilizava a proteína era KPO<sub>4</sub> 5 mM, 2,5 mg/ml de tre-halose.

(Segue Tabela)



Tabela IV

Formulação <sup>a</sup>	% de Proteína <sup>b</sup> Recuperada	% de Área <sup>c</sup> de Recuperação	Proteína Solúvel (Fracção em Massa do Total)			
			% de Trímero	% de Dímero	% de Intermediário	% de Monómero
<b>Sólidos Triturados</b>						
NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>	44,5	85,4	7,5	5,9	7,3	79,2
NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 8	85,7	100,	0,0	2,1	0,0	97,8
NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 8	87,6	100,	0,0	3,0	0,0	97,0
Manitol 10 mg/ml						
<b>Sólidos Homogeneizados<sup>d</sup></b>						
KPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 8, Tre-halose 2,5 mg/ml	97,3	100,	0,0	2,2	0,0	97,8
NaPO <sub>4</sub> 5 mM, pH 8, Manitol 10 mg/ml	96,8	100,	0,0	2,0	0,0	98,0
Succinato de Na 0,3M, Manitol 10 mg/ml pH7	94,3	100,	0,0	4,2	0,0	95,8

<sup>a</sup>Todas as amostras lyophilizadas a 10 mg/ml de rhGH com tampão e excipientes tal como mostrado.

<sup>b</sup>Proteína extraída de cloreto de metileno (fracção do total) tal como determinado por absorvância a

278 nm.

<sup>c</sup>Resultados de SEC-HPLC para proteína extraída para tampão após tratamento com cloreto de metileno.

<sup>d</sup>As formulações sólidas lyophilizadas foram homogeneizadas em cloreto de metileno a 25000 rpm durante 1 min.

Foram efectuados mais estudos para determinar se um tensioactivo podia estabilizar a interface cloreto de metileno-polipéptido. Assim, foi adicionado tensioactivo Tween à fase de cloreto de metileno e misturado com a hGH sólida (KPO<sub>4</sub>, pH 8). A adição de tensioactivo Tween à fase de cloreto de metileno não melhorou a estabilidade da hGH sólida (KPO<sub>4</sub>, pH 8) tal como mostrado na Tabela V. Adicionalmente, a utilização do tensioactivo, tensioactivo Span 80, na fase de cloreto de metileno não melhorou a estabilidade da hGH sólida (KPO<sub>4</sub>, pH 8). Outras tentativas com tensioactivo Tween na fase de cloreto de metileno não foram bem sucedidas para a formulação de hGH sólida mais estável (Manitol, KPO<sub>4</sub>, pH 8). Estes resultados juntamente com os estudos aquosos indicaram que de preferência não é utilizado tensioactivo Tween com estas formulações uma vez que este promove agregação e diminui a solubilidade de hGH tratada com cloreto de metileno.



Tabela V

Efeito do tensioactivo Tween na fase de cloreto de metíleno sobre a estabilidade de hGH sólida						
Tween em MeCl <sub>2</sub>	Polipéptido Solúvel (Fracção em Massa do Total)					
	% de Polipéptido <sup>a</sup> Recuperado	% de Área <sup>b</sup> de Recuperação	% de Trímero	% de Dímero	% de Intermediário	% de Monómero
Tween 80 a 0,01%	40,8	98,7	5,2	13,0	0,0	81,8
Tween 80 a 0,1%	40,8	102,9	8,0	14,0	0,0	77,9
Tween 80 a 1%	53,8	97,3	7,0	11,6	0,0	81,4

<sup>a</sup>Polipéptido extraído de cloreto de metíleno (fracção do total) tal como determinado por absorvância a 278 nm.

<sup>b</sup>Resultados de SEC-HPLC para polipéptido extraído para tampão após tratamento com cloreto de metíleno.

Para aumentar a quantidade de polipéptido carregado nas microesferas, a quantidade de excipiente deve ser minimizada. Por isso, foram utilizadas concentrações menores de manitol (2 e 5 mg/ml) com 10 mg/ml de hGH no tampão de formulação (NaHPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 8) e as soluções aquosas foram testadas quanto a estabilidade em cloreto de metíleno. Estas concentrações de manitol renderam menos 20% de monómero solúvel que a formulação de 10 mg/ml de manitol. Reduções significativas na concentração de manitol sacrificariam a qualidade do polipéptido libertado. Foram também tentados excipientes alternativos a concentrações mais baixas. Foi utilizada carboximetilcelulose (CMC) a 0,5, 2 e 5 mg/ml na formulação aquosa (10 mg/ml de hGH, NaHPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 8). A CMC a 0,5 mg/ml proporcionou a mesma fracção de monómero solúvel que a formulação de 10 mg/ml de manitol, mas a quantidade de polipéptido recuperado na fase aquosa foi 15% mais baixa. Foram também tentadas misturas de massas idênticas de CMC e manitol (1 mg/ml e 2,5 mg/ml de cada) para proporcionar estabilidade a concentrações mais baixas de excipiente. A utilização de 2,5 mg/ml de cada excipiente proporcionou resultados comparáveis à formulação de 10 mg/ml de manitol. As formulações de 0,5 mg/ml de CMC e de 2,5 mg/ml de CMC e de manitol foram por isso liofilizadas para avaliar a sua utilização para microencapsulação.

Para avaliar formulações quanto à utilização na forma aquosa, cada um dos materiais liofilizados foi reconstituído até à solubilidade máxima que foi definida como a concentração de polipéptido à qual não se dissolve polipéptido adicional na solução. A concentração máxima de hGH nesta experiência foi alcançada com a



formulação liofilizada em 10 mg/ml de manitol. Esta formulação foi reconstituída com sucesso com tampão NaHPO<sub>4</sub> 5 mM, pH 8 a 200 mg/ml de hGH (200 mg/ml de manitol, KPO<sub>4</sub> 100 mM) sem precipitação do polipéptido. A formulação sem excipientes (KPO<sub>4</sub>, pH 8) proporcionou a segunda melhor solubilidade a 165 mg/ml de hGH. No entanto, as tentativas para reconstituir as formulações de CMC e CMC/manitol a concentrações elevadas de polipéptido não foram bem sucedidas. Em ambos os casos, a formulação formou uma pasta a concentrações superiores a 100 mg/ml. O teste de cloreto de metíleno das pastas formadas a partir das formulações de CMC e CMC/manitol revelou que a quantidade de polipéptido recuperado era significativamente reduzida (menos de 75% de recuperação) em comparação com a formulação de manitol, mas a fracção solúvel era superior a 95% de monómero. Uma vez que uma formulação semelhante a gel pode ter utilidade para estabilização da fase aquosa interna no processo, foi também tentado outro agente de espessamento, gelatina. Para manter ainda uma concentração reduzida de excipiente e ao mesmo tempo obter uma formulação final em gel (200 mg/ml de hGH), a formulação de gelatina foi testada a 0,5 mg/ml de gelatina, 10 mg/ml de hGH, KPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 8. O teste de cloreto de metíleno desta formulação originou uma recuperação de monómero solúvel que era comparável à da formulação de 10 mg/ml de manitol. Por isso, esta formulação foi também liofilizada para posterior análise. A reconstituição do polipéptido liofilizado a 200 mg/ml de hGH (10 mg/ml de gelatina, KPO<sub>4</sub> 100 mM, pH 8) resultou na formação de uma pasta que tinha propriedades semelhantes às das formulações em CMC e CMC/manitol com a mesma concentração de hGH.

### EXEMPLO III

#### Estabilidade de Formulações de rhGH em Acetato de Etilo

A microencapsulação de proteínas em polímeros biodegradáveis requer frequentemente a utilização de solventes orgânicos para solubilizar o polímero. O polímero, tipicamente PLGA, polilactido (PLA) ou poliglicolído (PGA), é primeiro dissolvido num solvente orgânico que não é completamente miscível com água. Os solventes orgânicos vulgares utilizados neste processo são o cloreto de metíleno e acetato de etilo. Estes dois solventes têm propriedades físicas e químicas muito diferentes. Por isso, foi necessário avaliar a estabilidade de formulações de rhGH em ambos os solventes.

O teste de formulações de rhGH quanto à estabilidade em acetato de etilo foi efectuado através de um método semelhante ao utilizado para os estudos de cloreto de metíleno nos exemplos de cima. As soluções de rhGH a 10 mg/ml foram



preparadas adicionando rhGH sólida liofilizada (formulação de bicarbonato de sódio) para cada uma das formulações. Tal como mostrado na Tabela VI, as formulações foram preparadas com KPO<sub>4</sub> 5 mM, pH 8 e continham diferentes excipientes, PEG (PM 3350), manitol, tre-halose e Tween 20, ou combinações de excipientes. Cada uma das formulações de rhGH (100 µl) foi adicionada a 1 ml de acetato de etilo e submetida a ultra-sons durante 30 s para formar uma emulsão. Esta emulsão foi então misturada com 10 ml de KPO<sub>4</sub> 5 mM, pH 8 resultando numa diluição global de rhGH de 100 vezes. A rhGH extraída para o tampão foi analisada por HPLC de exclusão por tamanhos. Várias formulações originaram mais de 100% de recuperação da proteína solúvel indicando que a quantidade de proteína adicionada à emulsão era superior à quantidade estimada ( $0,1\text{ ml} \times 10\text{ mg/ml} = 1\text{ mg}$ ) como resultado da precisão das medições volumétricas. Adicionalmente, a recuperação de proteína solúvel e a quantidade de monómero recuperado foram geralmente superiores à de rhGH na mesma formulação tratada com cloreto de metileno. Globalmente, a recuperação de proteína solúvel foi a maior para tre-halose (1 & 2 mg/ml), tre-halose com PEG (10 mg/ml de cada), manitol com PEG (10 mg/ml de cada) e manitol com Tween 20 (10 mg/ml de cada). No entanto, apenas a tre-halose (1 & 2 mg/ml) e o manitol com Tween 20 (10 mg/ml de cada) tiveram também um alto teor de monómero (superior a 97%). A formulação de manitol/Tween 20 não permite uma solubilidade adequada para um processo de microencapsulação de emulsão dupla e requer uma razão de excipiente para proteína (em massa) de 4:1. Assim, a formulação óptima nestas experiências foi a formulação de 1 mg/ml de tre-halose (razão de excipiente para proteína de 1:10 e elevada solubilidade de rhGH).

(Segue Tabela)

Tabela VI

**Teste de acetato de etilo de formulações aquosas de rhGH tal como descrito no texto**

Formulação <sup>a</sup>	Recuperação <sup>b</sup> Solúvel	Proteína Solúvel (Fracção em Massa do Total)		
		% de Agregados Grandes	% de Dímero	% de Monómero
Sem excipiente	98,9	2,3	3,2	94,5
PEG (PM 3350) 10 mg/ml	99,8	2,7	2,3	94,9
PEG 5 mg/ml	108,5	1,7	3,0	95,2
PEG 2 mg/ml	107,2	1,8	3,8	94,3
Manitol 10 mg/ml	96,6	1,7	3,6	94,7
Manitol 2 mg/ml	86,3	4,1	3,8	92,2
Tre-halose 10 mg/ml	100,1	1,8	4,5	93,7
Tre-halose 2 mg/ml	119,8	0,4	2,0	97,7
Tre-halose 1 mg/ml	111,1	0,6	2,3	97,1
PEG (PM 3350) 10 mg/ml	115,6	3,8	2,9	93,3
Tre-halose 10 mg/ml				
PEG (PM 3350) 2 mg/ml	93,0	0,8	3,1	96,1
Tre-halose 2 mg/ml				
PEG (PM 3350) 1 mg/ml	95,8	4,5	3,3	92,2
Tre-halose 1 mg/ml				
PEG (PM 3350) 10 mg/ml	116,3	1,2	2,5	96,3
Manitol 10 mg/ml				
PEG (PM 3350) 2 mg/ml	106,5	1,7	2,7	95,6
Manitol 2 mg/ml				
Tween 20 a 0,1%	122,8	0,8	1,6	97,6
Manitol 10 mg/ml				

<sup>a</sup>Todas as soluções de teste iniciais continham 10 mg/ml de rhGH e KPO<sub>4</sub> 5 mM, pH 8 excepto três das formulações que tinham concentrações de rhGH de menos de 10 mg/ml (sem excipiente: 9,39 mg/ml; manitol 10 mg/ml/PEG 10 mg/ml: 7,84 mg/ml; manitol 10 mg/ml: 9,71 mg/ml).

<sup>b</sup>Resultados de SEC-HPLC para proteína extraída para tampão após tratamento com acetato de etilo. A percentagem de recuperação de proteína solúvel foi definida como a razão das concentrações a partir da área total do pico da amostra e dos controlos apropriados (da mesma formulação) vezes 100%. A concentração de rhGH de controlo foi determinada por absorvância a 278 nm e a concentração de rhGH da amostra foi calculada como uma diluição de 100 vezes do material de reserva com base nas diluições utilizadas no método global (0,1 ml em 1 ml de EtAc adicionado a 10 ml de tampão).



#### EXEMPLO IV

##### Estabilidade de Formulações de rhGH Secas por Pulverização em Solventes Orgânicos

A técnica da emulsão dupla (água-em-óleo-em-água) para microencapsulação pode apenas proporcionar uma carga moderada de fármaco no produto final. A carga de fármaco é limitada pela solubilidade do fármaco em água e pelo volume do fármaco aquoso que pode ser adicionado ao polímero em solvente orgânico. Volumes superiores a 0,5 ml de fármaco por grama de polímero resultam tipicamente numa grande explosão inicial de fármaco a partir das microesferas. Para evitar estas dificuldades, pode ser utilizada uma formulação sólida de fármaco em vez da solução aquosa de fármaco. Assim, pode ser utilizado um processo de sólido-em-óleo-em-água para produzir microesferas com alta capacidade de carga de fármaco (superior a 10%) com explosões reduzidas a moderadas.

A formulação sólida de fármaco utilizada para microencapsulação tem de ser estável em solventes orgânicos e tem de ter um tamanho pequeno (1-5 µm) relativamente às microesferas (30-100 µm) para permitir uma carga elevada e uma reduzida explosão do fármaco. Para formulações proteicas, um método de obtenção de pequenos sólidos secos é a secagem por pulverização. Um relatório recente de Mummenthaler *et al.*, *Pharm. Res.* 11(1): 12-20 (1994) descreve o processo de secagem por pulverização de formulações de rhGH. Uma vez que a rhGH é facilmente desnaturada por interacções superficiais tais como interfaces ar-líquido, a secagem por pulverização de rhGH tem de ser efectuada com tensioactivos na formulação de rhGH. No entanto, tal como observado acima, a presença de alguns tensioactivos pode ter um efeito negativo na estabilidade de rhGH em cloreto de metíleno. Formulações de rhGH secas por pulverização com diferentes tensioactivos e tre-halose, os quais foram acima observados como sendo os melhores para estabilização das formulações aquosas de rhGH, foram testadas quanto à estabilidade em cloreto de metíleno e acetato de etilo.

Foi preparada rhGH seca por pulverização a partir de cada uma das formulações listadas na Tabela VII. Estas formulações foram pulverizadas a 5 ml/min com uma temperatura de admissão de 90°C, um caudal no pulverizador de 600 l/h e um caudal de ar de secagem de 36 000 l/h. A rhGH seca por pulverização



foi então recolhida do filtro e das unidades de ciclone do secador por pulverização. O sólido final normalmente era de aproximadamente 5 µm de diâmetro.

O pó de rhGH seco por pulverização foi então testado quanto à estabilidade através de tratamento com acetato de etilo e cloreto de metíleno. Foi adicionada uma massa de pó seco por pulverização equivalente a 10 mg de rhGH a 2 ml do solvente orgânico num tubo de ensaio de vidro de 3 cm<sup>3</sup>. A suspensão foi de seguida homogeneizada a 10000 rpm durante 30 s com uma ponta de homogeneização microfina. Após a mistura, foram adicionados 20 µl da suspensão homogénea a 980 µl de KPO<sub>4</sub> 5 mM, pH 8 para extrair a proteína. A concentração de proteína extraída foi determinada por absorvância a 278 nm e a amostra foi também analisada por cromatografia de exclusão por tamanhos. Tal como mostrado na Tabela VII, a formulação sem tensioactivo teve a maior extensão de agregação quando tratada com cloreto de metíleno. Esta agregação era provavelmente o que resultasse da desnaturação superficial de rhGH durante o processo de secagem tal como anteriormente observado para a secagem por pulverização de rhGH. Adicionando Tween 20 ou PEG (PM 3350) à formulação, a quantidade de agregação para as amostras tratadas com cloreto de metíleno era reduzida, mas o rendimento de recuperação global era ainda baixo e o teor de monómero era muito inferior a 90%. Em contraste, se as mesmas formulações de rhGH seca por pulverização contendo tensioactivo eram tratadas com acetato de etilo, a quantidade de agregação era desprezável e era alcançada a recuperação completa de rhGH monomérica. Portanto, as formulações de rhGH secas por pulverização que consistiam em tre-halose e Tween 20 ou PEG (PM 3350) eram estáveis em acetato de etilo mas não protegiam a proteína de desnaturação em cloreto de metíleno.

(Segue Tabela)

Tabela VII

**Estabilidade de formulações sólidas de rhGH seca por pulverização em cloreto de metíleno e acetato de etilo**

Formulação	Proteína Solúvel				
	% de Recuperação <sup>a</sup> (Total)	% de Recuperação <sup>b</sup> (Solúvel)	% de Agregados Grandes	% de Dímeros	% de Monómero
<b>Testes com Cloreto de Metíleno</b>					
rhGH 15 mg/ml	-	-	12,3	8,8	75,4
Tre-halose 3,75 mg/ml					
rhGH 10 mg/ml	56,5	65,2	1,9	13,3	78,1
Tre-halose 2,5 mg/ml					
Tween 20 a 0,2%					
rhGH 10 mg/ml	50,7	56,7	3,9	12,3	77,7
tre-halose 2,5 mg/ml					
PEG (PM 3350) a 0,2%					
<b>Testes com Acetato de Etilo</b>					
rhGH 10 mg/ml	111,7	126,8	0,9	0,0	99,2
tre-halose 2,5 mg/ml					
Tween 20 a 0,2%					
rhGH 10 mg/ml	114,3	125,5	1,1	0,0	98,9
tre-halose 2,5 mg/ml					
PEG (PM 3350) a 0,2%					
rhGH 5,0 mg/ml	106,8	110,4	0,3	3,0	96,7
tre-halose 1,25 mg/ml					
Tween 20 a 0,2%					

<sup>a</sup>A recuperação total de proteína foi definida como a quantidade de proteína extraída para tampão após tratamento no solvente orgânico dividida pela quantidade calculada de proteína adicionada ao tampão de extracção (0,02 ml × 5 mg/ml).

<sup>b</sup>Resultados de SEC-HPLC para proteína extraída para tampão após tratamento com solvente orgânico. A percentagem de recuperação de proteína solúvel foi definida como a razão entre as concentrações da área total do pico da amostra e um padrão de referência vezes 100%. As concentrações de rhGH de controlo e de amostra foram determinadas por absorvância a 278 nm.



## EXEMPLO V

### Estabilidade de Formulações de rhGH Criodessecadas por Pulverização em Cloreto de Metileno e Acetato de Etilo

A secagem por pulverização a temperaturas elevadas pode ter um efeito prejudicial na proteína e produz partículas proteicas que são frequentemente esferas ocas (Mummenthaler et al., *Pharm. Res.* 11(1): 12-20 (1994). Adicionalmente, é difícil recolher as partículas pequenas (1-5 µm) necessárias para microencapsulação e o rendimento global destas partículas é normalmente muito baixo (menos de 50%). Uma alternativa à secagem por pulverização a altas temperaturas é a criodessecagem por pulverização. A criodessecagem por pulverização de formulações de rhGH resulta em partículas finas (2-3 µm) que prontamente se quebram em sólidos muito pequenos (menos de 1 µm). Este tipo de formulação sólida é preferido para microencapsulação numa matriz polimérica uma vez que pode proporcionar uma carga elevada (capaz de empacotar mais sólido em microesferas de 30-100 µm) de proteína sólida dispersa homogeneamente (explosão reduzida devido à suspensão fina).

A criodessecagem por pulverização de rhGH foi efectuada com as formulações listadas na Tabela VIII. Novamente, foi necessário um tensioactivo para estabilizar rhGH durante o processo de pulverização mas outras proteínas que não sejam facilmente desnaturadas através de interacções superficiais não necessitariam provavelmente da utilização de um tensioactivo. A rhGH criodessecada por pulverização foi preparada bombeando a formulação a 5 ml/min e operando o pulverizador a 600 l/h tal como utilizado para a secagem por pulverização a altas temperaturas (Mummenthaler et al., *Pharm. Res.* 11(1): 12-20, 1994). As soluções foram pulverizadas para um tabuleiro de metal aberto com azoto líquido. Após a pulverização, o tabuleiro foi colocado num liofilizador previamente arrefecido regulado para -30°C. Deixou-se evaporar o azoto líquido e a proteína foi então liofilizada (secagem primária: -30°C, 13,33 Pa (100 mTorr), 52 h; secagem secundária: 5°C, 13,33 Pa (100 mTorr), 18 h). O pó final foi então removido e colocado em frascos de vidro selados antes da sua utilização.

O pó de rhGH criodessecado por pulverização foi então testado quanto à estabilidade através de tratamento com acetato de etilo e cloreto de metileno. Foi adicionada uma massa de pó criodessecado por pulverização equivalente a 10 mg de rhGH a 2 ml do solvente orgânico num tubo de ensaio de vidro de 3 cm<sup>3</sup>. A

*[Handwritten signature]*

suspensão foi de seguida homogeneizada a 10000 rpm durante 30 s com uma ponta de homogeneização microfina. Após a mistura, foram adicionados 20 µl da suspensão homogénea a 980 µl de KPO<sub>4</sub> 5 mM, pH 8 para extrair a proteína. A concentração de proteína extraída foi determinada por absorbância a 278 nm e a amostra foi também analisada por cromatografia de exclusão por tamanhos. Tal como mostrado na Tabela VIII, a formulação criodessecada por pulverização contendo PEG era mais estável em cloreto de metileno do que a formulação contendo Tween 20 tal como observado acima com as formulações aquosas. No entanto, nenhuma das formulações originou uma alta recuperação de rhGH monomérica. Quando estas mesmas formulações foram tratadas com acetato de etilo, a recuperação completa de proteína monomérica foi alcançada com ambas as formulações. A tre-halose nas formulações proporcionou estabilização contra desnaturação em solvente orgânico (acetato de etilo) enquanto que os tensioactivos estabilizaram a proteína contra desnaturação superficial durante a criodessecagem por pulverização. Assim, as formulações criodessecadas por pulverização contendo tre-halose e um tensioactivo renderão uma recuperação completa de rhGH a partir de acetato de etilo.

Tabela VIII

Estabilidade de formulações sólidas de rhGH criodessecagem por pulverização em cloreto de metileno e acetato de etilo.					
Formulação	Proteína Solúvel				
	% de Recuperação <sup>a</sup> (Total)	% de Recuperação <sup>b</sup> (Solúvel)	% de Agregados Grandes	% de Dímeros	% de Monómero
<b>Testes com Cloreto de Metileno</b>					
rhGH 5 mg/ml tre-halose 1,25 mg/ml Tween 20 a 0,2 %	37,2	34,0	6,2	8,3	85,5
rhGH 5 mg/ml tre-halose 1,25 mg/ml PEG (PM 3350) a 0,2%	68,8	66,8	2,3	15,8	78,8
<b>Testes com Acetato de Etilo</b>					
rhGH 5 mg/ml tre-halose 1,25 mg/ml Tween 20 a 0,2%	94,6	117,7	0,5	0,9	98,7
rhGH 5 mg/ml tre-halose 1,25 mg/ml PEG (PM 3350) a 0,2%	97,7	104,7	0,6	0,0	99,4

<sup>a</sup>A recuperação total de proteína foi definida como a quantidade de proteína extraída para tampão após tratamento no solvente orgânico dividida pela quantidade calculada de proteína adicionada ao tampão de extracção (0,02 ml × 5 mg/ml).

<sup>b</sup>Resultados de SEC-HPLC para proteína extraída para tampão após tratamento com solvente orgânico. A percentagem de recuperação de proteína solúvel foi definida como a razão entre as concentrações da área total do pico da amostra e um padrão de referência vezes 100%. As concentrações de rhGH de controlo e de amostra foram determinadas por absorvância a 278 nm.

Lisboa, 7 FEV. 2001

Por GENENTECH, INC.

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO  
DA CUNHA FERREIRA  
Ag. Ol. Pr. Ind.  
Rua das Flores, 74 - 4.<sup>o</sup>  
1200 LISBOA



## REIVINDICAÇÕES

1. Método de estabilização de um polipéptido contra desnaturação quando tratado com um solvente orgânico, em que o método compreende a mistura do polipéptido com tre-halose, para formar uma mistura; e tratamento da mistura com um solvente orgânico.
2. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o polipéptido é seco ou liofilizado.
3. Método de formulação de um polipéptido compreendendo
  - (a) mistura do polipéptido numa solução aquosa com tre-halose; e
  - (b) tratamento do polipéptido numa solução aquosa com um solvente orgânico.
4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o produto do passo (a) é seco e reconstituído numa formulação aquosa.
5. Método de acordo com a reivindicação 3 ou a reivindicação 4 compreendendo ainda a formulação do polipéptido para libertação controlada.
6. Método de formulação de um polipéptido seco para libertação controlada compreendendo
  - (a) mistura do polipéptido com um excipiente, em que o referido excipiente é tre-halose; e
  - (b) tratamento do produto do passo (a) com um solvente orgânico.
7. Método de acordo com a reivindicação 6, compreendendo ainda a encapsulação do polipéptido numa matriz polimérica.
8. Composição para libertação controlada de um polipéptido compreendendo um polipéptido misturado com um excipiente, um solvente orgânico e uma matriz polimérica, em que o excipiente é tre-halose e o polipéptido e o excipiente são encapsulados na matriz polimérica.
9. Composição de acordo com a reivindicação 8 em que o polipéptido misturado com o excipiente está: (i) numa formulação aquosa; (ii) seco; ou (iii) liofilizado.

10. Composição de acordo com a reivindicação 8 ou a reivindicação 9 compreendendo ainda um tampão.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10 em que o tampão é um tampão de fosfato ou succinato.

12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 11 compreendendo ainda um conservante.

13. Método de acordo com a reivindicação 7 ou composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 10 em que o polímero é um polilactido.

14. Método ou composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que o polipéptido é uma hormona de crescimento ou interferão gama.

15. Método ou composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que o solvente orgânico é cloreto de metileno ou acetato de etilo.

16. Método ou composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que a razão em massa de tre-halose para polipéptido é de 100:1 a 1:100.

17. Método ou composição de acordo com a reivindicação 16 em que a razão em massa de tre-halose para polipéptido é de 1:1 a 1:10.

18. Método ou composição de acordo com a reivindicação 17 em que a razão em massa de tre-halose para polipéptido é de 1:3 a 1:4.

Lisboa, -7 FEV. 2001

Por GENENTECH, INC.

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO

