

(11) Número de Publicação: **PT 1734971 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/573 (2011.01) **C07K 1/00** (2011.01)

C07K 7/00 (2011.01) **C07K 14/00** (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2004.04.15**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2006.12.27**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.11.02**
024/2012

(73) Titular(es):

AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC.

9360 TOWNE CENTRE DRIVE SAN DIEGO, CA

92121 US

ALKERMES, INC. US

(72) Inventor(es):

STEVEN G. WRIGHT US

JOYCE M. HOTZ US

MICHAEL E. RICKEY US

RAJESH KUMAR US

TROY CHRISTENSON US

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA

AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DISPOSITIVO DE LIBERTAÇÃO SUSTENTADA BASEADO EM POLÍMERO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSIÇÕES PARA A LIBERTAÇÃO SUSTENTÁVEL DE POLIPÉPTIDOS BIOLOGICAMENTE ACTIVOS, E A MÉTODOS PARA FORMAR E UTILIZAR ESSAS COMPOSIÇÕES, PARA A LIBERTAÇÃO SUSTENTÁVEL DE POLIPÉPTIDOS BIOLOGICAMENTE ACTIVOS. AS COMPOSIÇÕES DE LIBERTAÇÃO SUSTENTÁVEL DA PRESENTE INVENÇÃO COMPREENDEM UM POLÍMERO BIOCOMPATÍVEL QUE TEM DISPERSADO NO SEU INTERIOR, UM POLIPÉPTIDO BIOLOGICAMENTE ACTIVO E UM AÇÚCAR.

RESUMO**"DISPOSITIVO DE LIBERTAÇÃO SUSTENTADA BASEADO EM
POLÍMERO"**

A presente invenção refere-se a composições para a libertação sustentável de polipéptidos biologicamente activos, e a métodos para formar e utilizar essas composições, para a libertação sustentável de polipéptidos biologicamente activos. As composições de libertação sustentável da presente invenção compreendem um polímero biocompatível que tem dispersado no seu interior, um polipéptido biologicamente activo e um açúcar.

DESCRIÇÃO

"DISPOSITIVO DE LIBERTAÇÃO SUSTENTADA BASEADO EM POLÍMERO"

Antecedentes da invenção

Inúmeras proteínas e péptidos, denominados colectivamente na presente memória polipéptidos, apresentam actividade biológica *in vivo* e são úteis como medicamentos. Muitas doenças ou afecções requerem a administração de um nível sustentado de medicamento para proporcionar os efeitos profilácticos e/ou terapêuticos mais eficazes. Os níveis sustentados com frequência conseguem-se mediante a administração de polipéptidos biologicamente activos por injeções subcutâneas frequentes, que geralmente dão como resultado níveis flutuantes de medicamento e um mal cumprimento da terapêutica por parte do paciente.

Como alternativa, pode utilizar-se a utilização de materiais biodegradáveis, como polímeros, que encapsulam o medicamento como um sistema de libertação sustentável. A utilização de polímeros biodegradáveis, por exemplo, em forma de micropartículas ou micro suportes, pode proporcionar uma libertação sustentável do medicamento utilizando a biodegradabilidade intrínseca do polímero para controlar a libertação do medicamento e proporcionando desta forma um nível sustentável mais uniforme de medicamento e um melhor cumprimento da terapêutica por parte do paciente.

No entanto, estes dispositivos de libertação sustentável com frequência podem apresentar uma elevada concentração inicial do medicamento e uma libertação mínima posteriormente, dando como resultado níveis de fármaco em soro fora da janela terapêutica e/ou uma baixa biodisponibilidade do medicamento. Além disso, a presença de polímero, as temperaturas fisiológicas e a respo

sta corporal à composição de libertação sustentável podem fazer que o medicamento se altere (por exemplo, se degrade ou se agregue) interferindo desta forma com o perfil de libertação desejado do medicamento.

Além disso, os métodos utilizados para formar composições de libertação sustentável podem dar como resultado uma perda de actividade do medicamento devido à instabilidade do medicamento e aos efeitos degradantes das etapas de processamento. Os efeitos degradantes são particularmente problemáticos quando o medicamento é um polipéptido. O documento WO 03/020245 revela uma formulação com baixas quantidades de exendina-4 e sacarose, que compreende ainda tampão acetato.

Portanto, existe a necessidade de um meio para administrar polipéptidos biologicamente activos de uma forma sustentável, em que a quantidade de polipéptido administrado esteja a níveis terapêuticos, e conserve a actividade e potência durante o período de libertação desejado. Embora se tenham desenvolvido muitos trabalhos dirigidos a estes problemas, são necessárias novas soluções.

Sumário da invenção

A invenção refere-se ao descobrimento de que se podem conseguir perfis de libertação superiores (como os caracterizados por uma relação entre $C_{máx}$ e $C_{média}$ de aproximadamente 3 ou menor) com uma formulação que contenha umas poucas componentes optimizando a relação entre óleo de silicone e polímero no processo de fabricação, conseguindo-se desta forma um baixo volume de poros. Esta invenção refere-se a composições para a libertação sustentável de polipéptidos biologicamente activos. As composições de libertação sustentável da presente invenção compreendem um polímero biocompatível, exendina-4, como polipéptido biologicamente activo, e sacarose. De acordo com a reivindicação 1, o polipéptido

e o açúcar dispersam-se no polímero. O polipéptido e o açúcar podem dispersar-se por separado ou, preferivelmente, juntos. A composição de libertação sustentável proporciona um perfil de libertação desejável e uniforme, caracterizado por ter uma relação entre $C_{\text{máx}}$ e $C_{\text{média}}$ de aproximadamente 3 ou menor.

A composição tem um volume total de poros de aproximadamente 0,1 ml/g ou menor. O volume total de poros é determinado utilizando porosimetria por intrusão de mercúrio.

O polímero biocompatível preferentemente é um polímero de poli(lactida co-glicolida).

Na presente memória também se descreve um método para formar composições para a libertação sustentável de agentes biologicamente activos, como polipéptidos, que compreende formar uma mistura combinando uma fase aquosa que compreende água, um agente, como um polipéptido solúvel em água, e um açúcar com uma fase oleosa que compreende um polímero biocompatível e um solvente para o polímero; formar uma emulsão de água em óleo, por exemplo, sonicando ou homogeneizando a mistura; adicionar óleo de silicone misturado para formar micropartículas embrionárias; transferir as micropartículas embrionárias a um solvente de inactivação para endurecer as micropartículas; recolher as micropartículas endurecidas; e secar as micropartículas endurecidas. Numa realização particular, o óleo de silicone adiciona-se numa quantidade suficiente para conseguir uma relação entre óleo de silicone e solvente polimérico de aproximadamente 1,5:1. Além disso ou como alternativa, o polímero está presente na fase oleosa a aproximadamente 10% p/v ou menos.

A exendina-4 está presente na composição descrita na presente memória a uma concentração de 5% p/p relativamente ao peso total da composição final. Além

disso, a sacarose está presente numa concentração de 2% p/p do peso final da composição.

A composição da presente invenção pode administrar-se a um ser humano, ou a outro animal, por injeção, implantação (por exemplo, por via subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intracranial e intradérmica), administração em membranas mucosas (por exemplo, por via intranasal, intravaginal, intrapulmonar ou através de um supositório), ou administração *in situ* (por exemplo, através de um enema ou pulverização de aerossol).

A composição é administrada numa quantidade terapêuticamente eficaz para tratar a um paciente que padece diabetes mellitus, tolerância à glucose alterada (TGA), obesidade, transtornos cardiovasculares (CV) ou qualquer outro transtorno que se possa tratar pela exendina-4.

A utilização de um açúcar nas composições de libertação sustentável da invenção melhora a biodisponibilidade do polipéptido biologicamente activo incorporado, por exemplo, péptidos antidiabéticos ou glucorreguladores, e minimiza a perda de actividade devida à instabilidade e/ou às interacções químicas entre o polipéptido e outros componentes contidos ou utilizados na formulação da composição de libertação sustentável, mantendo ao mesmo tempo um perfil de libertação excelente.

As vantagens das formulações de libertação sustentável descritas na presente memória incluem um maior cumprimento e aceitação por parte do paciente ao eliminar a necessidade da administração repetida, um maior efeito terapêutico benéfico ao eliminar as flutuações na concentração de agente activo nos níveis sanguíneos ao proporcionar um perfil de libertação desejável, e uma redução potencial da quantidade total de

polipéptidos biologicamente activos necessários para proporcionar um efeito terapêutico benéfico ao reduzir-se estas flutuações.

Breve descrição das figuras

A FIG. 1 é um gráfico que representa a relação entre o diâmetro médio de poros e a libertação *in vitro* para composições de libertação sustentável descritas no presente documento (A.S. = sulfato de amónio).

A FIG. 2 é um gráfico que representa o efeito da porosidade sobre a libertação *in vitro* de exendina-4 desde micropartículas e o impacto que têm as condições de processamento, particularmente a relação entre óleo de silicone e cloreto de metileno, sobre a porosidade das micropartículas formadas.

As FIGS. 3A-3B são explorações de MEB criogénicas para formulações de micropartículas seleccionadas descritas na presente memória.

As FIGS. 4A-4D são explorações de MEB criogénicas para formulações de micropartículas seleccionadas descritas na presente memória.

A FIG. 5 é um gráfico de % residual de etanol e cloreto de metileno face à Tg para formulações de micropartículas descritas na presente memória.

A FIG. 6 é uma curva farmacocinética representativa (concentração, pg/ml face ao tempo, dias, mostrando as caixas as concentrações durante o primeiro dia) para a Formulação 2-1 (3% de exendina-4 e 2% de sacarose), Formulação 1 (3% de exendina-4 sozinha) e Formulação 4 (3% de exendina-4 e 0,5% de sulfato de amónio).

A FIG. 7 é um gráfico do perfil de libertação *in vivo* para as três Formulações de micropartículas 2, 2-1 e 2-2.

A FIG. 8 é um gráfico dos dados farmacocinéticos para as Formulações de micropartículas 5-1, 5-2 e 5-3.

A FIG. 9 é um gráfico que representa a relação entre

parâmetros de método e o tamanho de emulsão interna conseguido pelo método.

Descrição detalhada da invenção

A invenção proporciona uma composição para a libertação sustentável de um polipéptido biologicamente activo, que compreende um polímero biocompatível que tem o polipéptido biologicamente activo dispersado no mesmo de tal forma que está presente a uma concentração de 5% (p/p) relativamente ao peso da composição, e sacarose dispersada no mesmo de tal forma que está presente em 2% (p/p) do peso da composição, em que o polipéptido biologicamente activo é exendina-4;

em que o volume total de poros da composição é de 0,1 ml/g ou menor, determinado utilizando porosimetria por intrusão de mercúrio; e

em que a composição está livre de tampão e sais de deslocamento salino.

A exendina-4 e a sacarose dispersam-se no polímero biocompatível em separado ou, preferentemente, juntas. Em particular, a composição de libertação sustentável é caracterizada por um perfil de libertação que tem uma relação entre a concentração máxima em soro ($C_{\text{máx.}}$) e a concentração média em soro ($C_{\text{média}}$) de aproximadamente 3 ou menor. Como é utilizado na presente memória, o termo um ou uma refere-se a um ou uma ou mais.

O agente

O polipéptido biologicamente activo é o polipéptido antidiabético ou gluco-regulador exendina-4.

A exendina-4 é um polipéptido de 39 aminoácidos. A sequência de aminoácidos da exendina-4 pode encontrar-se na Patente dos Estados Unidos N° 5.424.286 emitida a Eng em 13 de Junho de 1995. AC2993 e exenatide são sinónimos do termo exendina-4. Demonstrou-se em seres humanos e em animais que a exendina-4 estimula a secreção de insulina em presença de concentrações elevadas de glucose em

sangue, mas não durante períodos de baixas concentrações de glucose em sangue (hipoglucemia). Também foi demonstrado que suprime a secreção de glucagon, torna mais lento o esvaziamento gástrico e afecta a ingestão de alimentos e o peso corporal, além de ter outras acções. Assim, a exendina-4 e os análogos e agonistas da mesma podem ser úteis no tratamento da diabetes mellitus, TGA, obesidade, etc.

O açúcar

A quantidade de sacarose presente na composição de libertação sustentável, 2% (p/p), que proporciona excelentes perfis de libertação.

O polímero

Os polímeros adequados para formar a composição de libertação sustentável da presente invenção são polímeros biocompatíveis que podem ser polímeros biodegradáveis ou não biodegradáveis ou misturas ou copolímeros dos mesmos. Um polímero é biocompatível se o polímero e qualquer produto de degradação do polímero não é tóxico para o receptor e além disso não possui efeitos prejudiciais ou indesejados significativos sobre o corpo do receptor, como uma reacção imunológica substancial no sítio de injeção.

Biodegradável, como se define na presente memória, significa que a composição se degradará ou erosionará *in vivo* para formar unidades ou espécies químicas menores. A degradação pode produzir-se, por exemplo, por métodos enzimáticos, químicos e físicos. Os polímeros biocompatíveis e biodegradáveis adequados incluem, por exemplo, poli(lactidas), poli(glicolidas), poli(lactida-co-glicolidas), poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), policarbonatos, poliesteramidas, polianídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poli(dioxanonas), poli(alquilatos de alquilenos), copolímeros ou polietilenglicol e poliortoéster,

poliuretano biodegradável, misturas dos mesmos e copolímeros dos mesmos.

Os polímeros biocompatíveis não biodegradáveis adequados incluem polímeros não biodegradáveis seleccionados do grupo que consiste em poliacrilatos, polímeros de etileno-acetato de vinilo e outros acetatos de celulose acil-substituídos, poliuretanos não degradáveis, poliestirenos, poli(cloreto de vinilo), poli(fluoreto de vinilo), poli(vinil imidazol), poliolefinas clorosulfonadas, poli(óxido de etileno), misturas dos mesmos e copolímeros dos mesmos.

Os pesos moleculares aceitáveis para os polímeros utilizados na presente invenção podem determinar-se por um perito na especialidade tendo em conta factores como a velocidade de degradação do polímero desejada, propriedades físicas como resistência mecânica, química de grupos terminais e velocidade de dissolução do polímero em solvente. Tipicamente, um intervalo de pesos moleculares aceitável é de aproximadamente 2.000 Daltons a aproximadamente 2.000.000 de Daltons. Numa realização preferida, o polímero é um polímero ou copolímero biodegradável. Numa realização mais preferida, o polímero é uma poli(lactida-co-glicolida) (doravante "PLG") com uma relação lactida:glicolida de aproximadamente 1:1 e um peso molecular de aproximadamente 10.000 Daltons a aproximadamente 90.000 Daltons. Numa realização inclusive mais preferida, o peso molecular da PLG utilizada na presente invenção tem um peso molecular de aproximadamente 30.000 Daltons a aproximadamente 70.000 Daltons, como de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 60.000 Daltons.

As PLG podem possuir grupos terminais ácidos ou grupos terminais bloqueados, como os que se podem obter por esterificação do ácido. Obtiveram-se resultados excelentes com uma PLG com um grupo terminal ácido.

Os polímeros também se podem seleccionar com base na viscosidade intrínseca do polímero. As viscosidades intrínsecas adequadas incluem de aproximadamente 0,06 a 1,0 dl/g, como de aproximadamente 0,2 a 0,6 dl/g, mais preferentemente entre aproximadamente 0,3 e 0,5 dl/g. Escolhem-se polímeros preferidos que se degradarão em 3 a 4 semanas. Podem adquirir-se polímeros adequados em Alkermes, Inc., com o nome comercial Medisorb®, como os vendidos como 5050 DL 3A ou 5050 DL 4A. Também se podem utilizar PLG Resomer® de Boehringer Ingelheim, como Resomer® RG503 e 503H.

A composição de libertação sustentável da presente invenção pode configurar-se de muitas formas como uma película, um microgranulado, um cilindro, um disco ou uma micropartícula. Uma micropartícula, como é definida na presente memória, compreende um componente polimérico que tem um diâmetro menor de aproximadamente um milímetro e que tem um polipéptido biologicamente activo dispersado ou dissolvido no seu interior. Uma micropartícula pode ter uma forma esférica, não esférica ou irregular. Tipicamente, a micropartícula terá um tamanho adequado para a injeção. Um intervalo de tamanhos típico para as micropartículas é de 1000 micrómetros ou menor. Numa realização particular, a micropartícula varia de aproximadamente 1 a aproximadamente 180 micrómetros de diâmetro.

Excipientes adicionais

Embora seja possível acrescentar excipientes adicionais às formulações da invenção reivindicada, como é bem conhecido na especialidade, uma descoberta surpreendente da presente invenção é que se pode conseguir um perfil de libertação excelente com a formulação simples descrita na presente memória. Esses excipientes adicionais podem aumentar ou reduzir a velocidade de libertação do agente. Os ingredientes que

podem aumentar substancialmente a velocidade de libertação incluem agentes formadores de poros e excipientes que facilitam a degradação do polímero. Por exemplo, a velocidade de hidrólise do polímero aumenta num pH não neutro. Portanto, pode adicionar-se um excipiente ácido ou básico, como um ácido inorgânico ou base inorgânica, à solução de polímero utilizada para formar as micropartículas, para alterar a velocidade de erosão do polímero. Os ingredientes que podem reduzir substancialmente a velocidade de libertação incluem excipientes que reduzem a solubilidade em água do agente.

Foi uma descoberta surpreendente que não eram necessários agentes tamponantes como acetato, citrato, fosfato ou outros tampões biologicamente compatíveis na fase aquosa para conseguir uma formulação de libertação sustentável com exendina-4, com uma biodisponibilidade de boa a excelente. Também foi uma descoberta surpreendente que eram desnecessários os sais de deslocamento salino para controlar o estalido da exendina-4. Assim, as composições da invenção, como se descrevem na presente memória, se caracterizam na ausência substancial (ou completa) de tampão e/ou sais de deslocamento salino.

Administração

As composições da invenção podem administrar-se de acordo com métodos conhecidos geralmente na especialidade. A composição da presente invenção pode administrar-se a um paciente (por exemplo, um ser humano de que necessita o agente) ou outro animal, por injeção, implantação (por exemplo, por via subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intracranial e intradérmica), administração nas membranas mucosas (por exemplo, por via intranasal, intravaginal, intrapulmonar ou através de um supositório) ou administração *in situ* (por exemplo, mediante um enema ou pulverização de aerossol).

A composição de libertação sustentável pode administrar-se utilizando qualquer programa de dosagem que consiga os níveis terapêuticos desejados durante o período de tempo desejado. Por exemplo, a composição de libertação sustentável pode administrar-se e pode supervisionar-se ao paciente até os níveis de fármaco que se está a administrar regressarem ao valor basal. Após o retorno ao valor basal, pode administrar-se novamente a composição de libertação sustentável. Como alternativa, a administração posterior da composição de libertação sustentável pode realizar-se antes de conseguir níveis basais no paciente.

Por exemplo, a composição é administrada numa quantidade terapeuticamente eficaz para tratar um paciente que padece diabetes mellitus, diabetes tipo II, TGA, obesidade, transtornos cardiovasculares (CV) ou qualquer outro transtorno que se possa tratar por exendina-4.

A composição de libertação sustentável da presente invenção pode coadministrar-se com um corticosteroide. A coadministração da composição de libertação sustentável da invenção com um corticosteroide pode aumentar adicionalmente a biodisponibilidade do polipéptido biologicamente activo da composição de libertação sustentável. A coadministração de um corticosteroide em combinação com composições de libertação sustentável descreve-se com pormenor no Pedido de Patente dos Estados Unidos 60/419.430 intitulada, "Method of Modifying the Release Profile of Sustained Release Compositions" ("Método para modificar o perfil de libertação de composições de libertação sustentável") por Dasch et al.

Corticosteroides, como é definido na presente memória, refere-se a agentes anti-inflamatórios esteroideos também denominados glucocorticoides.

Os corticosteroides adequados incluem, mas sem

limitação, 21-Acetoxipregnenolona, Alclometasona, Algestona, Amcinonida, Beclometasona, Betametasona, Budesonida, Cloroprednisona, Clobetasol, Clobetasona, Clocortolona, Cloprednol, Corticosterona, Cortisona, Cortivazol, Deflazacort, Desonida, Desoximetasona, Dexametasona, Disflorasona, Diflucortolona, Difluprednato, Enoxolona, Fluazacort, Flucloronida, Flumetasona, Flunisolida, Flucinolona Acetonida, Fluocinonida, Fluocortin Butilo, Flucortolona, Fluorometolona, Acetato de Fluperolona, Acetato de Fluprednidenol, Fluprednisolona, Flurandrenolida, Propionato de Fluticasona, Formocortal, Halcinonido, Propionato de Halobetasol, Halometasona, Acetato de Halopredona, Halometasona, Hidrocortisona, Loteprednol Etabonato, Mazipredona, Medrisona, Meprednisona, Metilprednisolona, Mometasona Furoato, Parametasona, Prednicarbato, Prednisolona, 25 - Dietilamino acetato de Prednisolona, Fosfato Sódico de Prednisolona, Prednisona, Prednival, Prednilideno, Rimexolona, Tixocortol, Triamcinolona (todas as formas), por exemplo, Triamcinolona Acetonida, Éster metílico do ácido 21-oico de Triamcinolona Acetonida, Triamcinolona Benetonida, Triamcinolona Hexacetona, Diacetato de Triamcinolona, misturas farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos e sais dos mesmos e qualquer outro derivado e análogo dos mesmos.

É possível co-incorporar o corticosteroide na composição de libertação sustentável que compreende o polímero biocompatível e o agente polipeptídico biologicamente activo incorporado no seu interior.

O corticosteroide pode incorporar-se em separado num segundo polímero biocompatível. O segundo polímero biocompatível pode ser igual ou diferente do primeiro polímero biocompatível que tem o agente polipeptídico biologicamente activo incorporado no seu interior.

O corticosteroide pode estar presente num estado não encapsulado mas sim misturado com a composição de libertação sustentável. Por exemplo, o corticosteroide pode solubilizar-se no veículo utilizado para administrar a composição de libertação sustentável. Em alternativa, o corticosteroide pode estar presente como um sólido suspenso num veículo apropriado. Além disso, o corticosteroide pode estar presente como um pó que se mistura com a composição de libertação sustentável.

Entende-se que o corticosteroide está presente numa quantidade suficiente para aumentar a biodisponibilidade do polipéptido biologicamente activo desde composição de libertação sustentável. Uma maior biodisponibilidade refere-se a um aumento na biodisponibilidade do polipéptido biologicamente activo desde composição de libertação sustentável quando é coadministra com um corticosteroide em comparação com a administração em ausência do corticosteroide durante um período de tempo que começa dois dias após a administração e acaba no fim do ciclo de libertação para a formulação particular.

Como é utilizada na presente memória, paciente refere-se a um ser humano, como um ser humano que necessita do agente ou do procedimento de terapia, profilaxia ou diagnóstico.

Como é definido na presente memória, uma libertação sustentável de um polipéptido biologicamente activo é uma libertação do polipéptido desde composição de libertação sustentável da invenção que se produz durante um período que é maior do que o período durante o qual estaria disponível uma quantidade biologicamente significativa do polipéptido após a administração directa de uma solução do polipéptido. Prefere-se que uma libertação sustentável seja uma libertação que se produz durante um período de pelo menos aproximadamente uma semana, como pelo menos aproximadamente duas semanas, pelo menos aproximadamente

três semanas ou pelo menos aproximadamente quatro semanas. A libertação sustentável pode ser uma libertação contínua ou descontínua, com velocidades de libertação relativamente constantes ou variáveis. A continuidade da libertação e o nível de libertação podem ver-se afectados pelo tipo de composição polimérica utilizada (por exemplo, relações de monómeros, peso molecular, composição de bloco e combinações variáveis de polímeros), carga de polipéptido e/ou selecção de excipientes para produzir o efeito desejado.

Como é utilizado na presente memória, uma quantidade terapeuticamente eficaz, quantidade profilacticamente eficaz ou quantidade diagnosticamente eficaz à quantidade da composição de libertação sustentável necessária para induzir a resposta biológica desejada após a administração.

$C_{máx}$, como é utilizada na presente memória, é a concentração máxima em soro de fármaco que se produz durante o período de libertação que se supervisiona.

$C_{média}$, como é utilizada na presente memória, é a concentração média em soro de fármaco obtida dividindo a área sob a curva (ABC) do perfil de libertação pela duração da libertação.

Prefere-se que a relação entre $C_{máx}$ e $C_{média}$ seja de aproximadamente 3 ou menor. Este perfil é particularmente desejável para polipéptidos antidiabéticos ou glucorreguladores, como os descritos anteriormente. Uma relação de aproximadamente 3 ou menos pode proporcionar um valor de $C_{média}$ na janela terapêutica e evitar ao mesmo tempo efeitos secundários do fármaco adversos que se poderiam produzir com relações maiores.

Biodisponibilidade, como é utilizado esse termo na presente memória, refere-se à quantidade de produto terapêutico que atinge o sistema circulatório. A biodisponibilidade pode definir-se como a Área Sob a

Curva (ABC) calculada para o perfil de libertação de um polipéptido particular durante o período de tempo que começa após a administração e acaba num ponto de tempo predeterminado. Como se entende na especialidade, o perfil de libertação cria-se representando graficamente os níveis em soro de um agente biologicamente activo num sujeito (eixo Y) em pontos de tempo predeterminados (eixo X). Com frequência faz-se referência à biodisponibilidade em termos de % de biodisponibilidade, que é a biodisponibilidade conseguida para um polipéptido particular após a administração de uma composição de libertação sustentável dividida pela biodisponibilidade conseguida para um polipéptido particular após a administração intravenosa da mesma dose de fármaco, multiplicado por 100.

Uma modificação do perfil de libertação pode confirmar-se pela supervisão farmacocinética apropriada do soro do paciente relativamente à presença do agente polipeptídico biologicamente activo. Por exemplo, pode utilizar-se o ensaio baseado em anticorpos específicos (por exemplo, ELISA e IRMA), como é bem conhecido na especialidade, para determinar a concentração de determinados agentes polipeptídicos biologicamente activos no soro do paciente. Na presente memória descreve-se um exemplo desse ensaio para exendina-4.

Pode utilizar-se a supervisão farmacodinâmica do paciente para supervisionar os efeitos terapêuticos do agente no paciente, para confirmar a retenção da actividade biológica do agente libertado. Podem seleccionar-se métodos para supervisionar os efeitos farmacodinâmicos baseando-se no agente polipeptídico biologicamente activo que se está a administrar utilizando técnicas amplamente disponíveis.

Fabricação

Conhecem-se vários métodos através dos quais se

podem formar composições de libertação sustentável (matrizes de polímero/polipéptido biologicamente activo) da invenção, particularmente composições que têm baixa porosidade como se descreve na presente memória. Nos Exemplos de Trabalho expõem-se métodos detalhados para alguns métodos de formação de micropartículas. Numa realização preferida, o método da invenção para formar uma composição para a libertação sustentável de um polipéptido biologicamente activo inclui formar uma mistura combinando uma fase aquosa que compreende água, agente, como um polipéptido solúvel em água, e um açúcar com uma fase oleosa que compreende um polímero biocompatível e um solvente para o polímero; formar uma emulsão de água em óleo; adicionar um agente de coacervação, por exemplo óleo de silicone, óleo vegetal ou óleo mineral à mistura para formar micropartículas embrionárias; transferir as micropartículas embrionárias a um solvente de inactivação para endurecer as micropartículas; recolher as micropartículas endurecidas; e secar as micropartículas endurecidas. Este método geralmente é denominado na presente memória método água-óleo-óleo (W/O/O).

Preferentemente, o polímero pode estar presente na fase oleosa numa concentração que varia de aproximadamente 3% p/p a aproximadamente 25% p/p, preferentemente de aproximadamente 4% p/p a aproximadamente 15% p/p, como de aproximadamente 5% p/p a aproximadamente 10% p/p. Obtiveram-se resultados excelentes na presente memória utilizando uma concentração de 6% p/p de PLG na fase oleosa.

O polímero geralmente é combinado com um solvente de polímero. Quando o polímero é um PLG, como os preferidos na presente memória, o polímero é adicionado a um solvente para PLG. Esses solventes são bem conhecidos na especialidade. Um solvente preferido é cloreto de

metileno.

O agente e açúcar são adicionados na fase aquosa, preferentemente na mesma fase aquosa. A concentração de agente preferentemente é de 10 a 100 mg/g, preferentemente entre 50 e 100 mg/g. A concentração de açúcar preferentemente é de 10 a 50 mg/g e de 30 a 50 mg/g.

As duas fases posteriores misturam-se para formar uma emulsão. Prefere-se que a emulsão seja formada de modo que o tamanho das gotas de emulsão interna seja menor de aproximadamente 1 micrómetro, preferentemente menor de aproximadamente 0,7 micrómetros, mais preferentemente menor de aproximadamente 0,5 micrómetros, como de aproximadamente 0,4 micrómetros. Podem utilizar-se sonicadores e homogeneizadores para formar essa emulsão.

Um agente de coacervação, como é utilizado na presente memória, refere-se a qualquer óleo em que não seja solubilizada facilmente a solução de polímero (polímero e solvente) e deste modo forme uma fase diferente com a solução de polímero. Os agentes de coacervação adequados para utilização na presente invenção incluem, mas sem limitação, óleo de silicone, óleo vegetal e óleo mineral. Numa realização particular, o agente de coacervação é óleo de silicone e adiciona-se numa quantidade suficiente para conseguir uma relação entre óleo de silicone e solvente de polímero de aproximadamente 0,75:1 a aproximadamente 2:1. Numa realização particular, a relação entre óleo de silicone e polímero é de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1,5:1. Numa realização preferida, a relação entre óleo de silicone e polímero é de aproximadamente 1,5:1.

A mistura resultante adiciona-se a um inativador, que compreende um composto não solvente para o polímero. Os compostos não solventes para polímeros conhecem-se

geralmente na especialidade. Um inativador particularmente preferido compreende um sistema solvente de heptano/etanol.

O fármaco sólido também pode encapsular-se utilizando uma versão modificada do método descrito anteriormente. Este método modificado pode denominar-se sólido/óleo/óleo (S/O/O).

Por exemplo, suspendeu-se exendina-4 sólida em cloreto de metileno que continha 6% de PLG e sonicou-se durante aproximadamente quatro minutos em gelo. O método posterior realizou-se de uma forma análoga ao método W/O/O.

De seguida, a invenção será descrita adicionalmente e de forma específica mediante os seguintes exemplos.

Exemplos

Preparação de micropartículas I

As composições de libertação sustentável descritas na presente memória prepararam-se por um método de separação de fases. De seguida descreve-se o método geral para micropartículas que contêm exendina-4 e sacarose para um tamanho de lote de 1 kg.

A. Formação de emulsão interna de água em óleo

Criou-se uma emulsão de água em óleo com a ajuda de um homogenizador. Os homogeneizadores adequados incluem um homogenizador Megatron em linha MT-V 3-65 F/FF/FF, Kinematica AG, Suíça. A fase de água da emulsão preparou-se dissolvendo exendina-4 e excipientes como sacarose em água. A concentração de fármaco na solução resultante pode ser de aproximadamente 50 mg/g a aproximadamente 100 mg/g. Por exemplo, quando o fármaco é exendina-4, a concentração de fármaco em solução pode ser de aproximadamente 30 g a aproximadamente 60 g por 600 g de água. Numa realização particular, dissolveram-se 50 g de exendina-4 e 20 g de sacarose em 600 g de água para irrigação (WFI). As quantidades especificadas indicadas

anteriormente representam uma carga nominal sem ajuste para compensar a concentração de conteúdo de péptido específica para o lote de exendina-4 utilizado. A fase oleosa da emulsão foi preparada dissolvendo polímero PLGA (por exemplo, 930 g de PLGA DL4A 50:50 purificado (Alkermes, Inc.) em cloreto de metileno (14,6 kg o 6% p/p).

Depois foi adicionada a fase aquosa à fase oleosa para formar uma emulsão grossa com um misturador superior durante aproximadamente três minutos. Depois, a emulsão grossa homogeneizou-se a aproximadamente 10.000 rpm a temperatura ambiente. Isto deu como resultado um tamanho de gotas de emulsão interna menor que 1 micrómetro. Entende-se que a formação da emulsão interna pode conseguir-se utilizando qualquer meio adequado. Os meios adequados de formação de emulsões incluem, mas sem limitação, homogeneização, como foi descrito anteriormente, e sonicação.

B. Formação do coacervado

Depois foi realizada uma etapa de coacervação adicionando óleo de silicone (21,8 kg de Dimeticona, NF, 350 cs) durante um período de tempo de aproximadamente cinco minutos à emulsão interna. Isto é equivalente a uma relação de 1,5:1 entre óleo de silicone e cloreto de metileno. O cloreto de metileno da solução de polímero espalha-se no óleo de silicone e começa a precipitar o polímero em torno da fase aquosa que contém exendina-4, o que conduz à microencapsulação. As micro esferas embrionárias formadas desta forma são moles e requerem endurecimento. Com frequência, as micro esferas embrionárias deixam-se em repouso durante um curto período de tempo, por exemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos, antes de proceder à etapa de endurecimento das micro esferas.

C. Endurecimento de micro esferas e *clearance*

As micro esferas embrionárias transferiram-se imediatamente a uma mistura solvente de heptano/etanol. O volume necessário de mistura de heptano/etanol pode determinar-se com base no tamanho de lote de micro esferas, tipicamente uma relação entre cloreto de metileno e solvente de heptano/etanol de 16:1. No presente exemplo utilizaram-se aproximadamente 210 kg de heptano e 23 kg de etanol num depósito agitado e arrefecido a 3°C. Esta mistura de solventes endureceu a micro esferas por extracção de cloreto de metileno adicional das micro esferas. A etapa de endurecimento também pode denominar-se inactivação. Depois de inactivar-se durante 1 hora a 3°C, a mistura de solvente é decantada, adiciona-se mais heptano (13 kg) a 3°C e mantém-se durante 1 hora para retirar por *clearance* o óleo de silicone residual, etanol e cloreto de metileno da superfície das micro esferas ou estas bombeiam-se directamente à etapa de recolha.

D. Secagem e recolha de micro esferas

No fim da etapa de inactivação ou decantação/lavagem, as micro esferas foram transferidas e recolheram-se num Filtro/Secagemr Sweco Pharmasep de 12" Modelo PH12Y6. O filtro/secagem utiliza um crivo de recolha de múltiplas camadas de 20 micrómetros e está ligado a um motor que faz vibrar o crivo durante a recolha e a secagem. Realizou-se uma *clearance* final com heptano (6 kg a 3°C) para assegurar a máxima transferência em linha e para retirar qualquer excesso de óleo de silicone. As micro esferas depois foram secas sob vácuo com uma purga constante de gás nitrogénio a uma velocidade controlada de acordo com o seguinte programa: 6 horas a 3°C; 6 horas de elevação até 41°C; e 84 horas a 41°C.

Após finalizar a secagem, as micro esferas foram descarregadas num recipiente de recolha, foram peneiradas

através de uma peneira de 150 μm e armazenaram-se a aproximadamente -20°C até o enchimento.

Para todas as formulações de micropartículas que se prepararam na presente memória, a quantidade de polipéptido, por exemplo, exendina-4, e de excipientes presentes nas formulações preparadas expressa-se como % (p/p) baseado no peso final da composição de libertação sustentável. A % (p/p) é uma percentagem nominal, excepto quando indicado.

Preparação de micropartículas II

A. Formação de emulsão interna de água em óleo

Foi criada uma emulsão de água em óleo com ajuda de um sonicador. Os sonicadores adequados incluem Vibracell VCX 750 com uma cabeça de sonda modelo CV33, Sonics and Materials Inc., Newtown, CT. A fase aquosa da emulsão foi preparada dissolvendo exendina-4 e excipientes como sacarose em água. A concentração de fármaco na solução resultante pode ser de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. Por exemplo, quando o fármaco é exendina-4, a concentração de fármaco em solução pode ser de aproximadamente 3,28 g a aproximadamente 6,55 g por 65,5 g de água. Numa realização particular, dissolveram-se 5,46 g de exendina-4 e 2,18 g de sacarose em 65,5 g de água para irrigação ou WFI. As quantidades específicas indicadas anteriormente representam um excesso de 4% relativamente à carga alvo para compensar as perdas após a esterilização em filtro das componentes. A fase oleosa da emulsão preparou-se dissolvendo polímero PLGA (por exemplo, 97,7 g de PLGA DL4A 50:50 (Alkermes, Inc.) em cloreto de metileno (1539 g ou 6% p/v).

Depois foi adicionada a fase aquosa à fase oleosa durante um período de aproximadamente três minutos enquanto era sonicada a uma amplitude de 100% a temperatura ambiente. A fase aquosa foi bombeada através de um tubo de aço inox de 0,64 cm com uma extremidade de

tubo de HPLC de 2,54 cm (DI = 0,05 cm) a 5 psig, e adicionou-se por debaixo da sonda de sonicação até o interior da zona de sonicação. Depois, o reactor foi agitado a 1400-1600 rpm, com sonicação adicional a uma amplitude de 100% durante 2 minutos, seguido de uma manutenção de 30 segundos, e depois 1 minuto mais de sonicação. Isto deu como resultado um tamanho de gotas de emulsão interna menor de 0,5 micrómetros. Entende-se que a formação da emulsão interna pode conseguir-se utilizando qualquer meio adequado. Os meios adequados de formação de emulsões incluem, mas sem limitação, sonicação como foi descrito anteriormente e homogeneização.

B. Formação de coacervados

Depois se realizou uma etapa de coacervação adicionando óleo de silicone (2294 g de Dimeticona, NF, 350 cs) durante um período de tempo de aproximadamente três a cinco minutos à emulsão interna. Isto é equivalente a uma relação entre óleo de silicone e cloreto de metileno de 1,5:1. O cloreto de metileno da solução de polímero espalha-se no óleo de silicone e começa a precipitar o polímero em torno da fase aquosa que contém exendina-4, o que provoca a microencapsulação. As micro esferas embrionárias formadas desta forma são moles e requerem endurecimento. Frequentemente, deixa-se que as micro esferas embrionárias permaneçam em repouso durante um curto período de tempo, por exemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos antes de proceder à etapa de endurecimento de micro esferas.

C. Endurecimento e clearance de micro esferas

As micro esferas embrionárias após transferidas imediatamente a uma mistura solvente de heptano/etanol. O volume necessário de mistura de heptano/etanol pode determinar-se com base no tamanho de lote de micro

esferas. No presente exemplo, utilizaram-se aproximadamente 22 kg de heptano e 2448 g de etanol num depósito agitado e arrefecido a 3°C (de 350 a 450 rpm). Esta mistura solvente endureceu as micro esferas extraíndo o cloreto de metileno adicional das micro esferas. Esta etapa de endurecimento também pode denominar-se inactivação. Depois de ser inactivada durante 1 hora a 3°C, a mistura solvente foi decantada e foi adicionado mais heptano (13 kg) a 3°C e manteve-se durante 1 hora para retirar por *clearance* o óleo de silicone residual, etanol, e cloreto de metileno sobre a superfície das micro esferas.

D. Secagem e recolha de micro esferas

No fim da etapa de *clearance*, as micro esferas transferiram-se e recolheram-se num crivo multicamada de 20 micrómetros, de 15,24 cm de diâmetro dentro da câmara de secagem com forma de cone que actuou como filtro de extremidade cega. Realizou-se uma *clearance* final com heptano (6 kg a 4°C) para assegurar a transferência máxima em linha. As micro esferas depois foram secas com uma purga constante de gás nitrogénio a uma velocidade controlada de acordo com o seguinte programa: 18 horas a 3°C; 24 horas a 25°C; 6 horas a 35°C; e 42 horas a 38°C.

Após finalizar a secagem, as micro esferas são descarregadas num recipiente de recolha esterilizado de teflon/aço inox acoplado ao cone de secagem. O recipiente de recolha é selado, retira-se do cone de secagem e armazenado a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ até o enchimento. O material que fica no cone após a desmontagem para a limpeza é recolhido para a análise do conteúdo de fármaco. O rendimento foi de aproximadamente 100 gramas de micro esferas.

Para todas as formulações de micropartículas que se prepararam na presente memória, a quantidade de polipéptido, por exemplo, exendina-4 e excipientes

presentes nas formulações preparadas é expressada como % (p/p) baseado no peso final da composição de libertação sustentável. A % (p/p) é uma percentagem nominal, excepto quando indicado.

Polímero:

De seguida são indicados exemplos de polímeros PLG específicos adequados para a sua utilização. Todos os polímeros utilizados nos seguintes exemplos expõem-se na lista e todos os polímeros apresentados na lista obtiveram-se em Alkermes, Inc. of Cincinnati, OH e podem descrever-se como é indicado de seguida:

Polímero 2A: Poli(lactida-co-glicolida); relação lactida:glicolida 50:50; Peso molecular 12,3 kD; IV = 0,15 (dl/g).

Polímero 4A: Poli(lactida-co-glicolida); relação lactida:glicolida 50:50; Peso molecular 45-64 kD; IV = 0,45-0,47 (dl/g).

Purificação de PLG: conhece-se na especialidade (ver, por exemplo, Peptide Acylation by Poly(α -Hydroxy Esters) (Acilação de péptidos por poli(α -hidroxi ésteres)) por Lucke et al, Pharmaceutical Research, Vol. 19, N° 2, págs. 175-181, Fevereiro de 2002) que as proteínas e péptidos que se incorporam em matrizes de PLG podem alterar-se de forma indesejável (por exemplo, degradar-se ou modificar-se quimicamente) como resultado da interacção com produtos de degradação do PLG ou impurezas que ficam após a preparação do polímero. Assim, os polímeros de PLG utilizados na preparação da maioria das formulações de micropartículas descritas na presente memória purificaram-se antes da preparação das composições de libertação sustentável utilizando métodos de purificação reconhecidos na especialidade.

Métodos de caracterização:

Não foi determinado que os seguintes métodos de caracterização são adequados para identificar

micropartículas que proporcionarão um perfil de libertação desejável de agente activo.

MEB

Utilizou-se MEB para avaliar o tamanho de partículas, a forma e as características superficiais das micropartículas. A formação de imagens de MEB realizou-se num sistema SEM® Personal (ASPEX™, LLC). Todas as amostras foram depositadas mediante uma espátula em porta-amostras de MEB convencionais cobertos com uma fita adesiva de dupla camada de carbono. As amostras revestiram-se por pulverização catódica ("sputtering") com Au durante aproximadamente 90 segundos a uma corrente de emissão de 18 mA utilizando um aparelho de cobertura por pulverização catódica "Mini" Modelo SC 7620 (Energy Beam Sciences). Todas as imagens de MEB realizaram-se utilizando um feixe de electrões de 20 KeV num intervalo de ampliação de aproximadamente 250 a 2500 aumentos.

MEB criogénica

A secção transversal das micropartículas estudou-se utilizando MEB criogénica. A amostra de micropartículas misturou-se com solução HISTO PREP® (Fischer) e manteve-se num crióstato a -20°C durante uma noite. As micropartículas endurecidas colocaram-se num cobre-objectos de vidro e depois foram seccionados utilizando uma faca metálica. As partículas seccionadas colocaram-se num porta-amostras de alumínio, revestiram-se por pulverização catódica com platino e paládio e observaram-se com um microscópio electrónico de varrimento (Phillips 525 M). A observação visual das secções proporciona um método para determinar o grau de porosidade das micropartículas.

Medição da porosidade - intrusão de mercúrio

A distribuição do volume de poros nas micropartículas determinou-se utilizando um porosímetro por intrusão de mercúrio Modelo SutoPor IV 9500 Moden

(Micromeritics, Norcross, GA). Em resumo, introduziu-se de forma forçada mercúrio numa quantidade conhecida de micropartículas num penetrómetro aplicando pressão por etapas até uma pressão máxima de 413,57 MPa. Mediu-se o volume de mercúrio introduzido nos poros a diversas pressões. Este método quantifica a distribuição de poros nas micropartículas. Isto é, o tamanho dos poros em que foi introduzido mercúrio está relacionado inversamente com a pressão aplicada. O equilíbrio das forças internas e externas no sistema de líquido-sólido-vapor pode descrever-se pela equação de Washburn. A relação entre a pressão aplicada e o tamanho de poros em que se introduz mercúrio de forma forçada se descreve por:

$$D = -\frac{4\gamma \cos\theta}{P}$$

P

em que: D = diâmetro de poros

γ = tensão superficial (constante)

θ = ângulo de contacto (constante)

P = pressão

Portanto, o tamanho do poro em que será introduzido mercúrio é inversamente proporcional à pressão aplicada. Supondo que todos os poros são cilindros estreitos, o diâmetro médio dos poros ($D = 4V/A$) pode calcular-se dividindo o volume de poros ($V = \pi D^2 h / 4$) pela área do poro ($A = \pi D h$).

Solventes residuais

Foi utilizado apenas um método para a quantificação do heptano, etanol e cloreto de metileno, o equipamento consistia num cromatógrafo de gases HP 5890 Serie 2 com uma coluna Rtx 1301, 30 cm x 0,53 mm. Dissolveram-se aproximadamente 130 mg de micropartículas em 10 ml de N,N-dimetilformamida. Como padrão interno utilizou-se acetato de propilo. A preparação da amostra foi ajustada de forma que se pudessem quantificar concentrações de

cloreto de metileno tão baixas quanto 0,03%.

Preparação de micropartículas

Os lotes de micropartículas expostos na Tabela 1 prepararam-se como foi descrito anteriormente à escala de 100 gramas utilizando o polímero 4A e uma relação entre óleo de silicone e cloreto de metileno de 1,5:1 ou 1:1 e o óleo de silicone tinha uma viscosidade de 350 cs. Na Tabela 1 também se expõe a quantidade de exendina-4 e os excipientes utilizados na formulação.

TABELA 1

Nº de Lote	Formulação	Estalido <i>in vitro</i> (%)	Observações
02-019-147 (Nº 1) **	0% de sacarose, 0% de AS	0,40	Óleo de Si: MeCl2 1,5:1
02-019-167 (Nº 2) **	2% de sacarose (F16)	0,40	Óleo de Si: MeCl2 1,5:1
02-019-160 (Nº 2-1) **	2% de sacarose (F16)	0,44	Óleo de Si: MeCl2 1,5:1
02-019-164 (Nº 2-2) **	2% de sacarose (F16)	0,45	Óleo de Si: MeCl2 1,5:1
02-030-08 (Nº 2-3) **	2% de sacarose (F16)	0,80	Óleo de Si: MeCl2 1:1
02-030-01 (Nº 2-4) **	2% de sacarose (F16)	1,0	Óleo de Si: MeCl2 1:1
02-030-04 (Nº 2-5) **	2% de sacarose (F16)	1,1	Óleo de Si: MeCl2 1:1
02-019-136 (Nº 3-1) **	2% de sacarose, 0,5% AS (F14)	1,3	Inativador 50:50
02-019-115 (Nº 3-2) **	2% de sacarose, 0,5% AS (F14)	2,2	Óleo de Si: MeCl2 1,5:1
02-019-170 (Nº 4) **	0% de sacarose, 0,5% AS	3,8	Óleo de Si: MeCl2 1,5:1
02-019-133A (Nº 3-3) **	2% de sacarose, 0,5% AS (F14)	12,7	Inativador heptano a 100%

02-019-185 (N° 5) (carga de fármaco de 5%)	2% de sacarose (F17)	0,5	Carga de fármaco 5% Óleo de Si: MeCl2 1,5:1
02-019-64 (N° 3-4) **	2% de sacarose, 0,5% AS (F14)	0,5	Óleo de Si: MeCl2 1,5:1
02-019-10 (N° 3-5) **	2% de sacarose, 0,5% AS (F14)	1,30	Óleo de Si: MeCl2 1:1
02-001-196 (N° 3-6) **	2% de sacarose, 0,5% AS (F14)	2,70	Óleo de Si: MeCl2 1:1
02-019-24 (N° 3-7) **	2% de sacarose, 0,5% AS (F14)	6,70	Óleo de Si: MeCl2 1:1
* TODAS AS FORMULAÇÕES TINHAM UMA CARGA DE FÁRMACO DE 3% COM A EXCEPÇÃO DE POROSIDADE N° 5			
** Exemplo de referência			

Na TABELA 2 proporcionam-se o volume de intrusão total obtido a partir da porosimetria por intrusão de mercúrio e os diâmetros meios de poros calculados. A relação entre o diâmetro meio de poros e a libertação *in vitro* apresenta-se na FIG 1.

TABELA 2

N° de Lote	Volume total de poros (ml/g)	Estalido <i>in vitro</i> (%)	Diâmetro meio de poros (µm)
02-019-147 (N° 1) *	0,033	0,40	0,0068
02-019-167 (N° 2) *	0,035	0,40	0,0069
02-019-160 (N° 2-1) *	0,037	0,44	0,0070
02-019-164 (N° 2-2) *	0,035	0,45	0,0070
02-030-08	0,036	0,80	0,0070

(N° 2-3) *			
02-030-01 (N° 2-4) *	0,038	1,0	0,0073
02-030-04 (N° 2-5) *	0,039	1,1	0,0074
02-019-136 (N° 3-1) *	0,041	1,3	0,0073
02-019-115 (N° 3-2) *	0,039	2,2	0,0078
02-019-170 (N° 4) *	0,067	3,8	0,0125
02-019-133A (N° 3-3) *	0,513	12,7	0,0277
02-019-64 (N° 3-4) *	0,030	0,5	0,0060
02-019-10 (N° 3-5) *	0,060	1,30	0,0090
02-001-196 (N° 3-6) *	0,060	2,70	0,0100
02-019-24 (N° 3-7) *	0,180	6,70	0,0170
* Exemplo de referência			

A FIG. 1 representa o efeito de sulfato de amônio sobre a libertação inicial *in vitro*. Os dados indicam que a libertação inicial *in vitro* está correlacionada com o diâmetro de poros das micropartículas. As formulações realizadas com sulfato de amônio apresentaram níveis variáveis de libertação *in vitro* e porosidade variável, ao contrário das formulações sem sulfato de amônio que apresentaram uma porosidade e libertação uniformes. Durante a fabricação das micropartículas, a presença de sulfato de amônio na fase aquosa pode precipitar por deslocamento salino a substância farmacêutica durante a

preparação da emulsão interna. As diferenças no micro-ambiente dos precipitados podem contribuir para as diferenças em porosidade e, por isso, a variação na libertação inicial. O efeito não se observou em formulações preparadas sem sulfato de amónio. As formulações com sacarose e exendina-4 representam um nível mais desejável e uniforme de libertação inicial em comparação com formulações que tinham exendina-4, sacarose e sulfato de amónio.

A FIG. 2 representa adicionalmente o efeito da porosidade sobre a libertação *in vitro* e o impacto que as condições de processamento, particularmente a relação entre óleo de silicone e cloreto de metileno, tem sobre a porosidade das micropartículas formadas. Em resumo, as formulações de micropartículas preparadas utilizando uma relação entre óleo de silicone e cloreto de metileno de 1:1 (formulações 2-4 e 2-5 da Tabela 1) tem uma maior libertação inicial que as mesmas formulações preparadas utilizando uma relação entre silicone e cloreto de metileno de 1,5:1 (formulações 2, 2-1 e 2-2 da Tabela 1). A FIG. 2 sugere que uma maior relação entre óleo de silicone e cloreto de metileno tem como resultado uma menor porosidade que dá como resultado uma menor libertação inicial.

MEB Criogénica

A análise de MEB criogénica realizou-se como foi descrito anteriormente em Formulações dos tipos 2, 3 e 5 da Tabela 1. As FIGS. 3A-3B são explorações de micrografias para formulações seleccionadas de Tipo 2 (Formulação 2-2, FIG. 3A) e de Tipo 5 (5% de exendina-4, 2% de sacarose, FIG. 3B). As FIGS. 4A-D são explorações de micrografias para as formulações 3-4, 3-5, 3-6 e 3-7, respectivamente, da Tabela 1. Novamente, a variação na porosidade apresentada com a utilização de sulfato de amónio que pode contribuir para a variabilidade na

libertação inicial, pode ver-se nas secções transversais de MEB criogénica das FIGS. 4A-D.

Níveis de solventes residuais

O nível de solventes residuais numa formulação determinada pode afectar a Tg da formulação. Determinaram-se os níveis de solvente residual para formulações de micropartículas dos Tipos 2 e 5 da Tabela 1. Utilizou-se apenas um método para a quantificação de heptano, etanol e cloreto de metileno. O equipamento consistia num cromatógrafo de gases HP 5890 Série 2 com uma coluna Rtx 1301, 30 m x 0,53 mm. Dissolveram-se aproximadamente 130 mg de micropartículas em 10 ml de N,N-dimetilformamida. Como padrão interno utilizou-se acetato de propilo. A preparação da amostra ajustou-se de forma que se pudessem quantificar concentrações de cloreto de metileno tão baixas como 0,03%.

A FIG. 5 é um gráfico de % de etanol residual e cloreto de metileno para formulações dos Tipos 2 e 5 da Tabela 1 (3 ou 5% de exendina-4, 2% em sacarose). A FIG. 5 representa que a Tg se reduz segundo aumenta a quantidade de solvente residual.

Preparação de micropartículas que têm 3% de exendina-4 e 2% de sacarose

Por força da variação na porosidade introduzida pela presença de sulfato de amónio nas formulações de micropartículas e a identificação da porosidade como uma característica que afecta significativamente a libertação inicial, não se investigou o sulfato de amónio nas descobertas adicionais.

Impacto do tamanho de gotas da emulsão interna

O seguinte estudo realizou-se para determinar o impacto de parâmetros do processo sobre a formação da emulsão interna bem como a estabilidade da emulsão resultante e a libertação *in vitro* de 24 horas resultante de micro esferas produzidas utilizando os diferentes

parâmetros do método. Formaram-se emulsões internas da fase aquosa e a fase de solvente por sonicação como foi descrito anteriormente para a escala de 100 g ou homogeneização utilizando um homogenizador MT5000 com um gerador 36/4 (Kinematica AG, Suíça) a baixa velocidade (10.800 rpm) ou alta velocidade (21.300 rpm). Após a formação da emulsão interna pelas diferentes técnicas, as emulsões mantiveram-se no reactor com agitação suave com um agitador superior durante 5, 15 ou 60 minutos antes de extrair uma alíquota. Após os tempos de manutenção designados, a emulsão interna foi processado adicionalmente como foi descrito anteriormente em micropartículas e depois se determinou a libertação *in vitro* de 24 horas para cada lote como foi descrito posteriormente.

A caracterização do tamanho de gotas de emulsão interna pode determinar-se utilizando um analisador do tamanho de partículas **Horiba**

Extraiu-se uma alíquota da emulsão interna do reactor utilizando uma pipeta de vidro. Utilizando uma pipeta de transferência, adicionaram-se ~ 30 gotas da emulsão interna a ~ 10 ml da solução de polímero PLG 4A 50:50 Medisorb® a 6% numa via de cintilação tapado a rosca de 20 cc seguido de mistura. A solução de polímero PLG 4A 50:50 Medisorb® a 6% também serviu como solução-alvo de referência. Depois foram transferidas aproximadamente 9 ml de esta amostra de emulsão diluída a um suporte de amostra Horiba limpo de 10 ml. Colocou-se uma cobertura sobre o suporte de amostra para impedir a evaporação rápida do solvente do polímero. A amostra preparada estava dentro do intervalo de leitura de % de transmissão aceitável de 0,65% - 0,90% segundo a barra azul (lâmpada). Selecionou-se um índice de refração relativo de 0,94-0,00i na preparação do programa. A amostra depois foi medida por um analisador do tamanho de

partículas Horiba como o modelo LA 910 para o tamanho de gotas. Na Figura 9 apresentam-se os dados que correlacionam os parâmetros do método e o tamanho de emulsão interna conseguido durante os tempos de manutenção de 5, 15 e 60 minutos, bem como os resultados de libertação *in vitro* de 24 horas resultantes (entre parênteses).

Caracterização das micro esferas

As micro esferas de exendina-4 se caracterizaram rotineiramente relativamente ao conteúdo de fármaco, tamanho de partículas, solventes residuais, libertação inicial *in vitro* de características PK em ratinhos. O fármaco extraiu-se para obter uma avaliação preliminar de pureza de exendina-4 após a encapsulação em lotes seleccionados.

Libertação inicial *in vitro*

A libertação inicial de exendina-4 foi determinada medindo a concentração de exendina-4 após 1 hora em tampão de libertação (HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). Colocaram-se 150 ± 5 mg de micro esferas em 5,0 ml de tampão HEPES 10 mM, NaCl 100 mM pH 7,4 a temperatura ambiente, agitaram-se vorticialmente durante aproximadamente 30 segundos para suspender a solução e depois foram colocados numa câmara-de-ar a 37°C durante 1 hora. Após 1 hora, as amostras foram retiradas da câmara e inverteram-se várias vezes para ser misturadas, seguido de centrifugação a 3500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e foi analisado imediatamente por HPLC utilizando as seguintes condições: coluna: TSK-GEL® 7,8 mm x 30 cm, 5 m (TSOH BIOSEP PART N° 08540); temperatura de forno da coluna: ambiente; temperatura de sistema automático de alimentação: 6°C; caudal: 0,8 ml/minuto; detecção: 280 nm; volume de injeção: 10 l; fase móvel: 35% de acetonitrilo/65% de água com 0,1% de TFA/litro (v/v); tempo de processo: aproximadamente 20

minutos. Como padrão utilizou-se a substância farmacêutica a granel exendina-4, 0,2 mg/ml preparada em tampão acetato 30 mM, pH 4,5.

Estudos em animais

Todos os estudos farmacocinéticos (PK) descritos na presente memória realizaram-se em ratinhos Sprague-Dawley macho adultos que pesavam aproximadamente 500 ± 50 g.

Para a caracterização PK das formulações de micropartículas, cada animal recebeu uma injeção subcutânea de micropartículas suspensas em diluente (3% de carboximetilcelulose, NaCl a 0,9%, Tween 20 a 0,1%) na região inter-escapular. Em geral, a dose foi de aproximadamente 1,0 mg de exendina-4 por ratinho num volume de injeção de 0,75 ml. As amostras de sangue foram recolhidas através da veia lateral da cauda a 0,5, 2, 4, 6, 10 e 24 horas, e 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 e 28 dias após a dose. As amostras de sangue colocaram-se imediatamente em tubos MICROTAINER® que continham EDTA e centrifugaram-se a aproximadamente 14.000 X g durante aproximadamente dois minutos. Depois se transferiu plasma a tubos MICROTAINER® sem aditivo e foram armazenados a -70°C até o momento do ensaio. Utilizou-se IRMA para determinar as concentrações de exendina em plasma.

Libertação de IRMA in vivo

O método para quantificar a exendina-4 em plasma é um imuno-ensaio de tipo sanduíche, com o analito capturado por um anticorpo monoclonal EXE 4:2-8.4 em fase sólida e detectado pelo anticorpo monoclonal marcados com Iodo GLP-1:3-3. A quantidade de contas é quantificada a partir de uma curva de calibração padrão. Este ensaio é específico para uma exendina-4 de comprimento completo ou intacto e não detecta exendina-4 (3-39). Um intervalo de curva padrão típico +e de 30 pg/ml a 2000 pg/ml consoante a idade do anticorpo indicador.

Libertação in vitro e in vivo

As formulações 2, 2-1 e 2-2 (3% de exendina-4 e 2% de sacarose) ensaiaram-se relativamente à libertação inicial *in vitro* como foi descrito anteriormente. A libertação *in vitro* foi de 0,4%, 0,4% e 0,5%, respectivamente. Os três lotes também tinham uma libertação inicial relativamente baixa *in vivo* no intervalo de 1154 a 1555 pg/ml para C_{máx} 0-1 dia. A FIG. 6 é uma curva farmacocinética representativa das formulações que têm 3% de exendina-4 e 2% de sacarose (2-1) e também para as que têm 3% de exendina-4 sozinha (1) e 3% de exendina-4 e 0,5% de sulfato de amónio (4). Utilizou-se uma relação entre óleo de silicone e cloreto de metileno de 1,5:1 e a viscosidade do óleo de silicone foi de 350 cs.

A partir da FIG. 6 pode ver-se que as formulações que não contêm sulfato de amónio apresentam uma menor libertação inicial. Embora a formulação que tinha exendina-4 sozinha tenha apresentado uma libertação inicial adequada, a pureza do fármaco após a encapsulação reduziu-se em comparação com a formulação que tinha a exendina-4 em combinação com a sacarose. A adição de açúcar nas formulações reduz a degradação do agente.

Na FIG. 7 é apresentado o perfil de libertação *in vivo* para as três formulações 2, 2-1 e 2-2 comparadas anteriormente. Os três lotes apresentaram uma libertação inicial relativamente baixa seguida de um "vale" (níveis baixos em soro entre aproximadamente o dia 4 e o dia 17), seguida de uma libertação sustentável durante aproximadamente o dia 21 ao dia 28. A baixa libertação inicial e a forma do perfil de libertação foram uniformes para as três formulações.

Formulação que usa uma relação 1:1 entre óleo de silicone e cloreto de metileno

As formulações 2-3, 2-4 e 2-5 da Tabela 1 (3% de exendina-4, 2% de sacarose) prepararam-se utilizando uma

relação 1:1 entre óleo de silicone e cloreto de metileno. A libertação inicial foi superior para estas formulações que para as formulações 2, 2-1 e 2-2 da Tabela 1 (3% de exendina-4, 2% de sacarose com uma relação entre silicone e cloreto de metileno de 1,5:1). Especificamente, as formulações de relação 1,5:1 proporcionaram uma libertação inicial média de aproximadamente 0,4%, enquanto as formulações de relação 1:1 proporcionaram uma libertação inicial média de aproximadamente 1,0%. Observou-se a mesma tendência *in vivo* com $C_{\text{máx}}$ 0-1 dias em ratinhos de 2288 ± 520 pg/ml para uma relação 1:1, enquanto a $C_{\text{máx}}$ 0-1 dia em ratinhos foi de 1300 ± 221 pg/ml para a relação 1,5:1.

Aumento de carga de fármaco

O aumento da carga de exendina-4 a 4% enquanto se mantinha a sacarose a 2% deu como resultado uma libertação inicial *in vitro* e *in vivo* no mesmo intervalo que para a carga de 3%.

Prepararam-se três formulações de Tipo 5 da Tabela 1 (carga de fármaco de 5%, 2% de sacarose, relação entre óleo de silicone e cloreto de metileno 1,5:1). Os três lotes, 5-1, 5-2 e 5-3 apresentaram uma baixa libertação inicial *in vitro* que variava de 0,2 a 0,5%. De forma semelhante, a $C_{\text{máx}}$ *in vivo* das formulações foi sistematicamente baixa variando de 467 pg/ml a 1267 pg/ml. A FIG. 8 representa um gráfico dos dados farmacocinéticos para os três lotes ensaiados. Em comparação com o comportamento da formulação de 3% de exendina-4 que tinha um 2% de sacarose, as formulações de 5% apresentavam maiores níveis em soro de fármaco durante aproximadamente o dia 1 e o dia 2. O resto do perfil para as formulações de 5% era semelhante ao das formulações de 3% que tinham um vale seguido da libertação de fármaco principalmente durante o dia 21 ao dia 28.

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição para a libertação sustentável de um polipéptido biologicamente activo, que compreende um polímero biocompatível que tem o polipéptido biologicamente activo disperso no mesmo de forma que esteja presente em 5% (p/p) do peso da composição, e sacarose dispersada no mesmo de forma que esteja presente em 2% (p/p) do peso da composição, em que o polipéptido biologicamente activo é exendina-4;

em que o volume total de poros da composição é de 0,1 ml/g ou menor, como é determinado utilizando porosimetria por intrusão de mercúrio; e

em que a composição está livre de tampão e sais de deslocamento salino.

2. A composição de libertação sustentável da reivindicação 1, em que o polímero biocompatível é seleccionado do grupo que consiste em poli(lactidas), poli(glicolidas), poli(lactida-co-glicolida), poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), policarbonatos, poliesteramidas, polianídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poli(dioxanonas), poliuretanos biodegradáveis, misturas dos mesmos e copolímeros dos mesmos.

3. A composição de libertação sustentável da reivindicação 1, em que o polímero biocompatível é seleccionado entre poli(lactidas), poli(glicolidas), poli(lactida-co-glicolidas), poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos) e misturas e copolímeros dos mesmos.

4. A composição de libertação sustentável da reivindicação 1, em que o polímero biocompatível

compreende poli(lactida-co-glicolida).

5. A composição de libertação sustentável da reivindicação 4, em que o polímero biocompatível é poli(lactida-co-glicolida) 50:50 purificada.

6. A composição de libertação sustentável de uma qualquer das reivindicações 1 a 5, que está na forma de micropartículas.

7. Uma composição de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 6, para utilização no tratamento da diabetes de tipo 2.

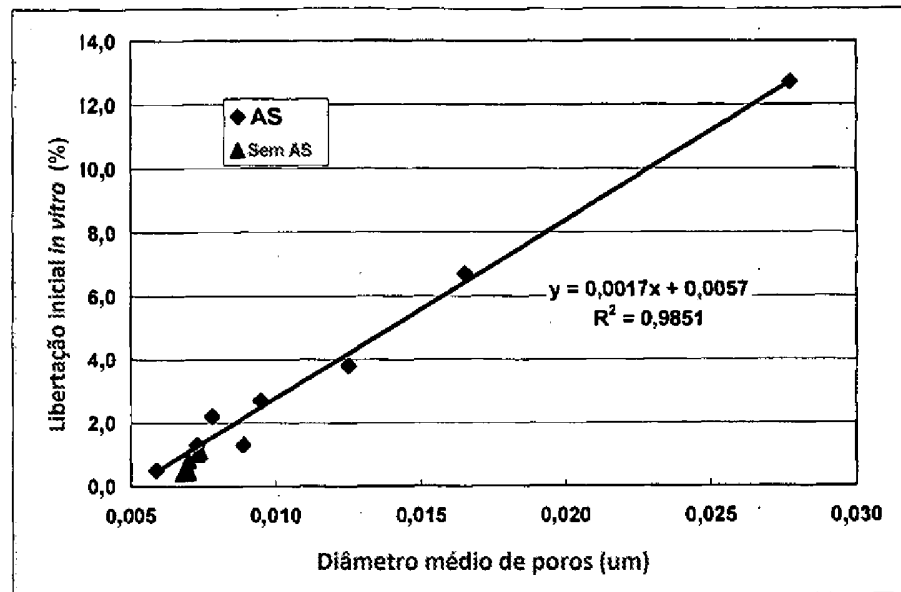


FIG. 1

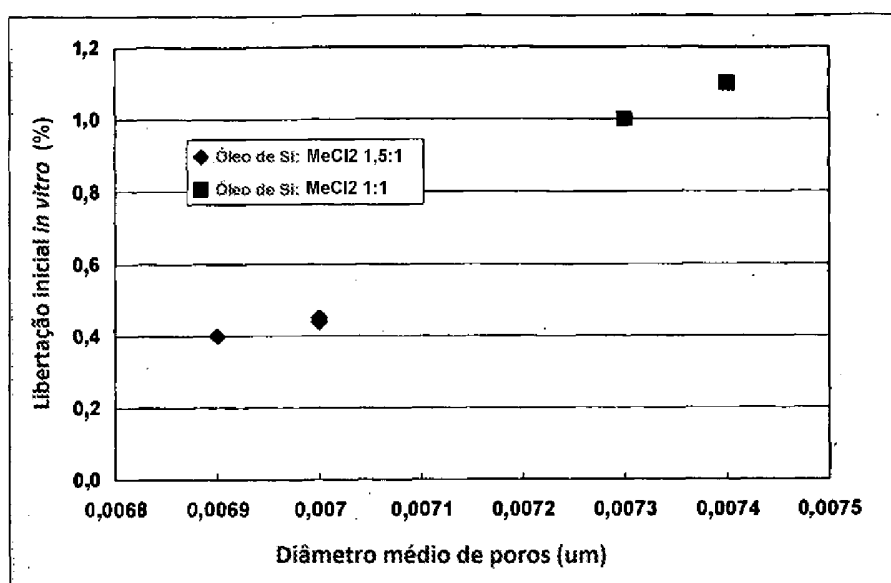


FIG. 2



FIG. 3A

FIG. 3B

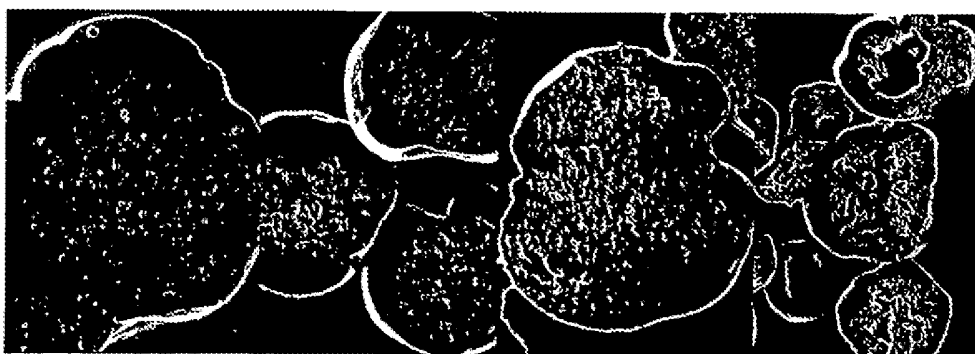


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

FIG. 4D

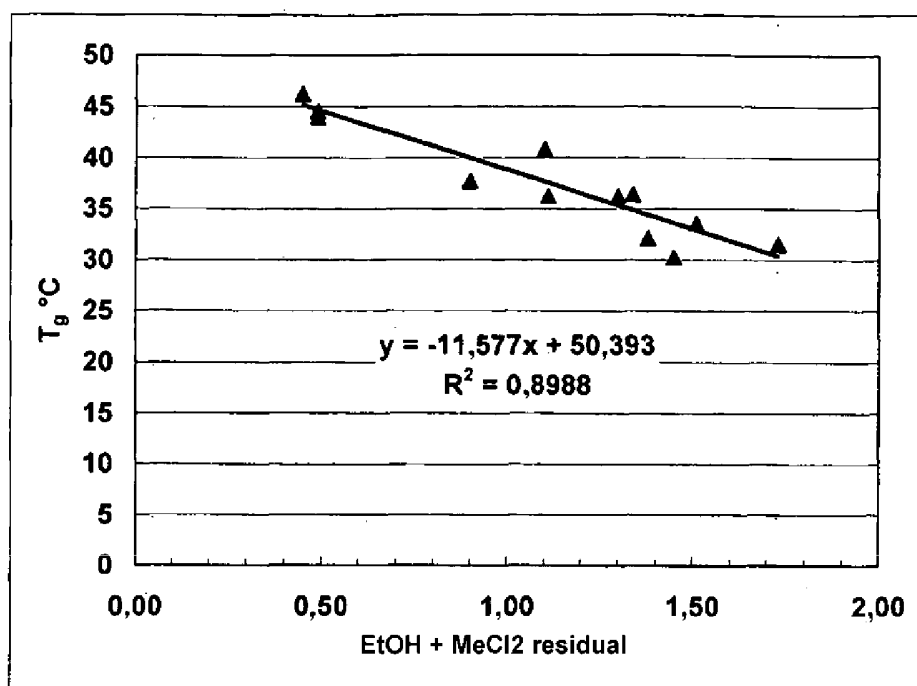


FIG. 5

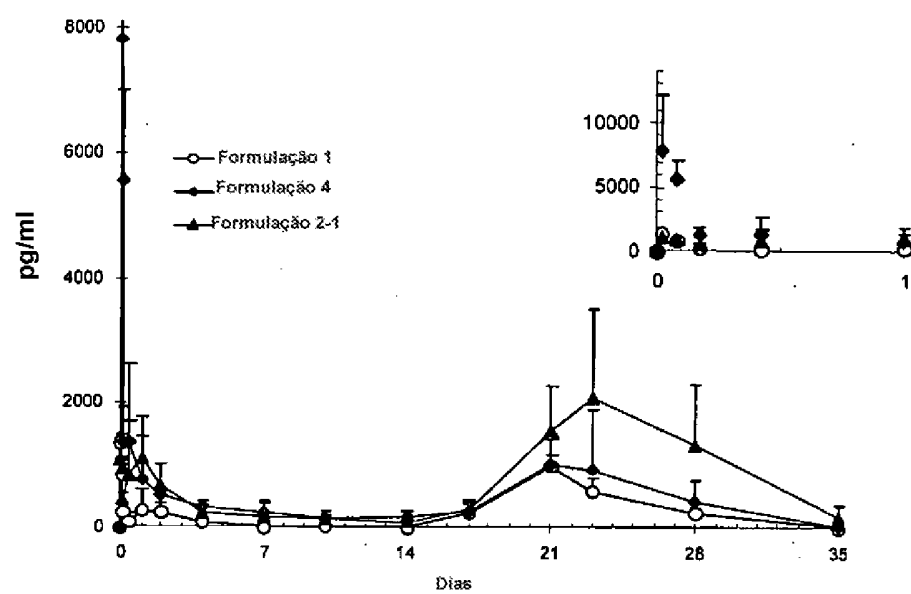


FIG. 6

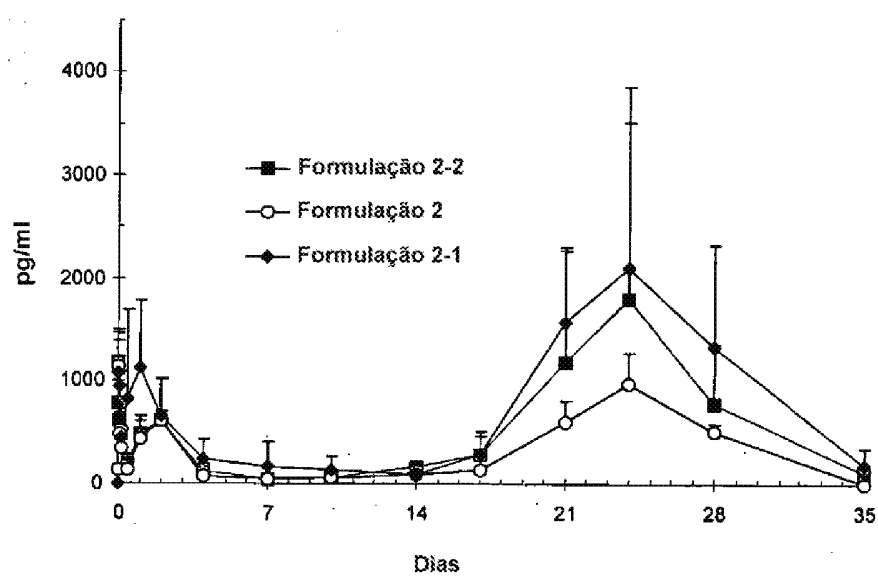


FIG. 7

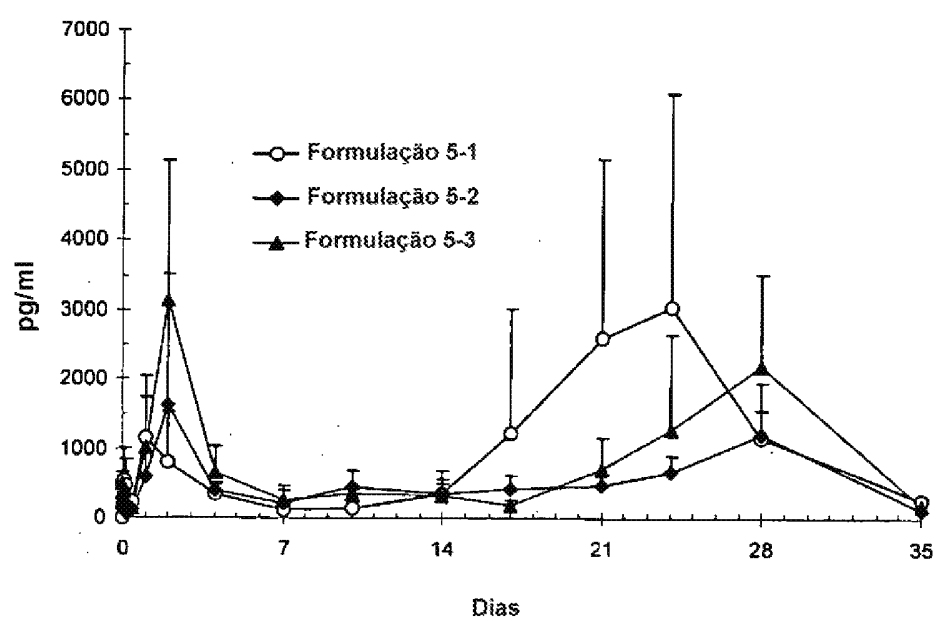


FIG. 8

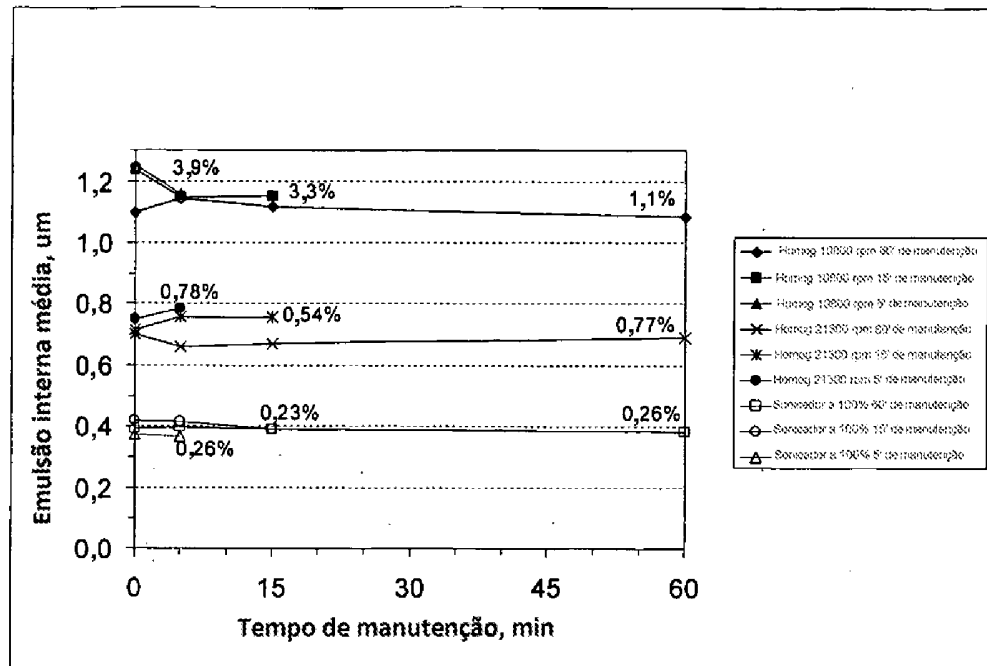


FIG. 9