(11) Número de Publicação: **PT 1397155 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 33/30 (2015.01) ***A61K 9/00*** (2015.01)
A61K 38/27 (2015.01) ***A61K 47/26*** (2015.01)

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

(22) Data de pedido: **2002.06.21**

(30) Prioridade(s): **2001.06.21 US 300275 P**
2002.06.21 US 176961

(43) Data de publicação do pedido: **2004.03.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.09.30**
239/2015

(73) Titular(es):
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO CA 94080-4990 **US**

(72) Inventor(es):
FRANKLIN OKUMU **US**
JEFFREY L. CLELAND **US**

(74) Mandatário:
JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA
RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÃO DE LIBERTAÇÃO SUSTENTADA**

(57) Resumo:
UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDE UMA PROTEÍNA, UM POLIOL E UM METAL. A PROTEÍNA É ESTABILIZADA PELO POLIOL E O METAL, E É PROTEGIDA CONTRA A DESNATURAÇÃO QUANDO EM CONTACTO COM UM SOLVENTE ORGÂNICO. O POLIOL PODE SER UM HIDROCARBONETO CONTENDO DOIS OU MAIS GRUPOS HIDROXILO (-OH) LIGADOS A CARBONO. O METAL PODE SER DIVALENTE.

RESUMO

FORMULAÇÃO DE LIBERTAÇÃO SUSTENTADA

Uma composição compreende uma proteína, um poliol e um metal. A proteína é estabilizada pelo poliol e o metal, e é protegida contra a desnaturação quando em contacto com um solvente orgânico. O poliol pode ser um hidrocarboneto contendo dois ou mais grupos hidroxilo (-OH) ligados a carbono. O metal pode ser divalente.

DESCRIÇÃO

FORMULAÇÃO DE LIBERTAÇÃO SUSTENTADA

ANTECEDENTES

Terapêuticas à base de proteínas podem ser mais difíceis de administrar a pacientes que outros produtos farmacêuticos. Uma vez que a eficácia de uma proteína se encontra relacionada com a sua conformação, as formulações terapêuticas não podem ser sujeitas a condições que contribuem para o desdobramento, ou desnaturação, da proteína. É tipicamente utilizado cuidado especial na preparação, armazenamento e administração de terapêuticas à base de proteínas. Além de evitar qualquer desnaturação da proteína, é frequentemente desejável controlar a quantidade da proteína administrada a um paciente ao longo do tempo. Isto ajuda a evitar concentrações proteicas dentro do paciente que são indesejavelmente elevadas ou que são demasiado baixas para ser eficazes. Terapêuticas à base de proteínas de libertação controlada podem ser administradas através de uma variedade de métodos, incluindo administração oral de comprimidos ou cápsulas, inalação de pós e implantação de depósitos a partir dos quais a proteína é gradualmente libertada.

A preparação destas formulações inclui tipicamente misturar a proteína com um solvente orgânico. Por exemplo, uma formulação em pó pode ser fabricada pulverizando uma mistura da proteína e um solvente orgânico em azoto líquido. Alternativamente, a proteína pode ser misturada com uma solução de um polímero bioerodível num solvente orgânico, com formação de micropartículas que contêm a proteína e o polímero através de coagulação da mistura. Além disso, proteínas, formulações em pó, ou micropartículas podem ser misturadas com um solvente orgânico para produzir um líquido ou gel que pode ser injetado num paciente. Um inconveniente da utilização de solventes orgânicos é a sua tendência a causar desnaturação de proteínas.

Foram utilizados aditivos para estabilizar proteínas em presença de um solvente orgânico desnaturante. Estes aditivos incluem tensioativos (Patente U.S. N.º 5.096.885), aminoácidos (Patente U.S. N.º 4.297.344), poliois (Patente U.S. N.º 5.589.167), polímeros naturais (documento WO 8903671), polímeros sintéticos (Pharm. Res. 8:285-291,1991) e metais (Patente U.S. N.º 6.191.107 B1).

Existe uma necessidade de estabilização melhorada de proteínas durante a preparação, armazenamento e administração de terapêuticas à base de proteínas. Formulações proteicas que têm boa estabilidade em solventes orgânicos seriam úteis numa ampla variedade de aplicações de libertação controlada.

BREVE SUMÁRIO

Num primeiro aspeto, a presente invenção é uma composição compreendendo uma proteína, um poliol e zinco, conforme definido nas reivindicações.

Num segundo aspeto, a presente invenção refere-se à utilização de uma composição para a preparação da formulação, conforme definido nas reivindicações.

Num terceiro aspeto, a presente invenção é um método de fabricar uma composição de libertação sustentada, compreendendo misturar um complexo e um portador líquido para formar a dita composição de libertação sustentada. O portador líquido compreende acetato-isobutirato de sacarose; e o complexo compreende uma proteína, um poliol e zinco, conforme definido nas reivindicações.

Num quarto aspeto, a presente invenção é um *kit* contendo um recipiente, uma proteína, um poliol, zinco e um portador líquido, conforme definido nas reivindicações. O portador líquido compreende acetato-isobutirato de sacarose.

A presente invenção proporciona uma composição, e a utilização da mesma, compreendendo uma proteína, um álcool e zinco, conforme definido nas reivindicações. O álcool é selecionado a partir do grupo consistindo num monossacarídeo, um polissacarídeo, glicerol, manitol, sorbitol, inositol e

polietilenoglicol.

A presente invenção proporciona um método de fabricar uma composição de libertação sustentada, compreendendo misturar um complexo e um portador líquido para formar a dita composição de libertação sustentada. O portador líquido compreende acetato-isobutirato de sacarose; e o complexo compreende uma proteína, um álcool e zinco, conforme definido nas reivindicações. O álcool é selecionado a partir do grupo consistindo num monossacarídeo, um polissacarídeo, glicerol, manitol, sorbitol, inositol e polietilenoglicol.

A presente invenção proporciona um *kit* contendo um recipiente, uma proteína, um álcool, zinco, e um portador líquido conforme definido nas reivindicações. O portador líquido compreende acetato-isobutirato de sacarose. O álcool é selecionado a partir do grupo consistindo num monossacarídeo, um polissacarídeo, glicerol, manitol, sorbitol, inositol e polietilenoglicol.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Vários outros objetos, características e vantagens associadas da presente invenção serão mais completamente apreciadas à medida que a mesma se torna melhor compreendida a partir da seguinte descrição detalhada quando considerada em conexão com os desenhos acompanhantes nos quais os caracteres de referência designam partes iguais ou correspondentes ao longo das várias vistas e em que:

A Figura 1 é uma vista de um frasco contendo uma composição injetável.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção refere-se à estabilização de uma proteína com um poliol e um metal, protegendo a proteína da desnaturação quando em contacto com um solvente orgânico. O grau de retenção da conformação da proteína nativa é um efeito surpreendente e inesperado da combinação de uma proteína tanto com um poliol como com um metal. O poliol e metal em conjunto proporcionam uma proteção sinérgica da conformação e atividade

da proteína que é maior do que seria esperado a partir do efeito que quer o poliol quer o metal têm separadamente.

O poliol é um álcool, e pode ser qualquer hidrocarboneto contendo dois ou mais grupos hidroxilo (-OH) ligados a carbono, onde hidrocarboneto se refere a um composto contendo carbono e hidrogénio, que pode também conter heteroátomos tais como oxigénio, azoto, enxofre, fósforo e halogéneo. O termo poliol exclui aqueles compostos que não proporcionam uma recuperação de monómero de pelo menos 40%, de acordo com o seguinte teste:

Uma mistura de hormona do crescimento humana recombinante (rhGH, GENENTECH, S. São Francisco, CA) em bicarbonato de sódio a 25 mM (25 mg rhGH/ml) é combinada com acetato de zinco para proporcionar uma relação molar de 10:1 de zinco para hormona do crescimento. A esta mistura é adicionado 1 por cento em peso (% em p.) do poliol a ser testado. Uma amostra de 1,0 mg desta mistura é então adicionada a N-metil pirrolidona (NMP), proporcionando uma relação de massa proteica (mg) para volume de solvente (ml) de 5 mg/ml. A mistura resultante é homogeneizada durante 2 min a 8.000 rpm com uma ponta de homogeneizador de cisalhamento e então incubada a 37 °C durante 24 horas. A rhGH é recuperada através de diluição num excesso de 10 vezes de um tampão de estabilização (EDTA a 5 mM, HEPES a 50 mM, NaN_3 a 0,01%, pH 8,0). A quantidade e qualidade da proteína recuperada nesta etapa são então determinadas através de cromatografia de exclusão de tamanho-cromatografia líquida de alto desempenho (SEC-HPLC), utilizando uma coluna TSK 2000-SWXL de 7,8 X 300 mm à temperatura ambiente, com uma fase móvel de NaH_2PO_4 a 50 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,2, uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min, e um tempo de corrida de 20 min. É injetada proteína (10 µg) e o eluente é monitorizado quanto a absorvância a 214 nm.

Exemplos de poliois incluem monossacarídeos, tais com glucose, frutose e ribose, incluindo isómeros cíclicos; glicerol; manitol; sorbitol; inositol; polissacarídeos, incluindo dissacarídeos tais como sacarose, trealose, lactose,

maltose e celobiose, e trissacarídeos tais como 3-fucossilactose e trissacarídeo do grupo sanguíneo B; e poliéteres tais como polietilenoglicóis (PEGs). O termo "poliéter" significa um hidrocarboneto contendo três ou mais ligações éter (CO-C). O poliol pode ser substituído. "Substituído" significa que a fração contém pelo menos um, preferentemente 1-3 substituintes). Substituintes adequados incluem éter (-O-C), amino ($-NH_2$), oxi (-O-), carbonilo (>C=O), tiol e semelhantes. Preferentemente, o poliol é manitol, trealose ou um polietilenoglicol. Polietilenoglicóis preferidos têm uma massa molecular, conforme medida através de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) desde 400 kDa até 8.000 kDa. Mais preferentemente, o polietilenoglicol tem uma massa molecular desde 400 kDa até 3.500 kDa. É preferido que o poliol tenha massa molecular menor do que cerca de 70.000 kDa.

As quantidades relativas de proteína e poliol numa formulação podem ser eleitas para minimizar a desnaturação proteica. Para uma determinada proteína, a relação ideal pode variar dependendo do poliol utilizado. Preferentemente, a relação de massa de trealose para proteína é desde 100:1 até 1:100. Mais preferentemente, a relação de massa de trealose para proteína é desde 1:1 até 1:10. Ainda mais preferentemente, a relação de massa de trealose para proteína é desde 1:3 até 1:4. Preferentemente, a relação de massa de manitol para proteína é desde 100:1 até 1:100. Mais preferentemente, a relação de massa de manitol para proteína é desde 1:1 até 1:10. Ainda mais preferentemente, a relação de massa de manitol para proteína é desde 1:1 até 1:2. Preferentemente, a relação de massa de PEG para proteína é desde 100:1 até 1:100. Mais preferentemente, a relação de massa de PEG para proteína é desde 1:1 até 1:10.

O metal é preferentemente divalente. Mais preferentemente, o metal é zinco. O metal pode ser adicionado à proteína através de mistura de uma solução aquosa da proteína com um complexo metálico. Por exemplo, um complexo de zinco tal

como acetato de zinco, óxido de zinco ou carbonato de zinco pode ser adicionado a uma solução ou suspensão da proteína num tampão. Preferentemente, a relação molar de metal para proteína é desde 1:1 até 100:1. Mais preferentemente, a relação molar de metal para proteína é desde 1:1 até 20:1. Ainda mais preferentemente, a relação molar de metal para proteína é desde 1:1 até 10:1.

Proteínas úteis na presente invenção incluem, por exemplo, moléculas tais como citocinas e recetores das mesmas, bem como proteínas quiméricas compreendendo citocinas ou recetores das mesmas, incluindo, por exemplo fator alfa e beta de necrose tumoral, recetores dos mesmos (TNFR-1; Gray *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 87:7380-7384; e TNFR-2; Kohno *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 87:8331-8335) e derivados dos mesmos; renina; hormonas do crescimento, incluindo hormona do crescimento humana, hormona do crescimento bovina, metionina-hormona do crescimento humana, desfenilalanina-hormona do crescimento humana, e hormona do crescimento suína; fator de libertação de hormona do crescimento (GRF); hormonas da paratiroide e pituitária; hormona estimulante da tiroide; fator de libertação de hormona pancreática humana; lipoproteínas; colchicina; prolactina; corticotrofina; hormona tirotrópica; oxitocina; vasopressina; somatostatina; lipressina; pancreozimina; leuprólido; alfa-1-antitripsina; cadeia A de insulina; cadeia B de insulina; pró-insulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; fator de libertação de hormona luteinizante (LHRH); agonistas e antagonistas de LHRH; glucagão; fatores de coagulação tais como fator VIIIC, fator IX, fator tecidual e fator de von Willebrand; fatores anticoagulação tais como Proteína C; fator natriurético atrial; tensioativo pulmonar; um ativador de plasminógeno para além de um ativador de plasminógeno de tipo tecidual (t-PA), por exemplo uma uroquinase; bombesina; trombina; fator de crescimento hematopoiético; encefalinase; RANTES (regulada na

ativação, normalmente expressa e secretada por células T); proteína inflamatória de macrófagos humana (MIP-1-alfa); uma albumina sérica tal como albumina sérica humana; sustância inibidora mülleriana; cadeia A da relaxina; cadeia B da relaxina; prorrelaxina; péptido associado a gonadotropina de ratinho; gonadotropina coriónica; hormona libertadora de gonadotropina; somatotropina bovina; somatotropina suína; uma proteína microbiana, tal como beta-lactamase; DNase; inibina; ativina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); recetores para hormonas ou fatores de crescimento; integrina; proteína A ou D; fatores reumatoides; um fator neurotrófico tal como fator neurotrófico derivado de osso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, ou -6 (NT-3, NT-4, NT-5, ou NT-6), ou um fator de crescimento nervoso tal como NGF-β; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento fibroblástico tal como aFGF e bFGF; fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento transformante (TGF) tal como TGF-alfa and TGF-beta, incluindo TGF-β1, TGF- β2, TGF- β3, TGF- β4, ou TGF- β5; fator de crescimento semelhante a insulina I e II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de ligação a fator de crescimento semelhante a insulina; proteínas CD tais como CD-3, CD-4, CD-8 e CD-19; eritropoietina; fatores osteoindutivos; imunotoxinas; uma proteína morfogénica óssea (BMP); um interferão tal como interferão-alfa; -beta, -gama, e interferão consenso; fatores estimulantes de colónias (CSFs), por exemplo, M-CSF, GM-CSF, e G-CSF; interleucinas (ILs), por exemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutase; recetores de células T; proteínas de membrana de superfície; fator acelerador do decaimento; antigénio viral tal como, por exemplo, uma porção da glicoproteína do envelope de VIH-1, gp120, gp160 ou fragmentos dos mesmos; proteínas de transporte; recetores de migração dirigida; adresinas; inibidores da fertilidade tais como as prostaglandinas; promotores da fertilidade; proteínas reguladoras; anticorpos e proteínas quiméricas; tais como

imunoadesinas; análogos e derivados destes compostos, e sais farmaceuticamente aceitáveis destes compostos, ou análogos ou derivados dos mesmos.

Preferentemente, a proteína contém até 120 aminoácidos por cadeia simples. Preferentemente, a proteína é capaz de formar complexos com um metal. A formação de complexos proteína-metal tem uma constante de dissociação (K_D) na ordem de micromolar (μM) ou menor, conforme medido em água a uma temperatura e pH fisiológicos. O valor K_D é definido como o produto da concentração do metal não complexado e da proteína não complexada, dividido pela concentração do complexo proteína-metal. Uma interação não específica entre uma proteína e um metal sob as mesmas condições tem uma K_D na ordem de milimolar (mM). Preferentemente, o complexo proteína-metal tem uma K_D de 0,1 μM ou menor. Mais preferentemente, o complexo proteína-metal tem uma K_D de 0,01 μM ou menor.

Mais preferentemente, a proteína é uma hormona do crescimento, tal como hormona do crescimento humana (hGH), hormona do crescimento humana recombinante (rhGH), hormona do crescimento bovina, metionina-hormona do crescimento humana, desfenilalanina-hormona do crescimento humana e hormona do crescimento suína; insulina, cadeia A de insulina, cadeia B de insulina e pró-insulina; ou um fator de crescimento, tal como fator de crescimento endotelial vascular-(VEGF), fator de crescimento nervoso (NGF), fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante (TGF), e fator de crescimento semelhante a insulina I e II (IGF-I e IGF-II).

Formulações de proteínas que são estabilizadas com um poliol e um metal podem também conter outros ingredientes. Estes ingredientes incluem, por exemplo, conservantes, antioxidantes, agentes espessantes, tensioativos, agentes quelantes, agentes emulsificantes e outros excipientes. O termo "excipiente" refere-se a um agente não terapêutico

adicionado a uma composição farmacêutica para proporcionar uma consistência ou efeito estabilizante desejado. Conservantes incluem, por exemplo, fenol, álcool benzílico, metacresol, metil parabeno, propil parabeno, cloreto de benzalcónio e cloreto de benzetónio. Tensioativos incluem, por exemplo, POLYSORBATE 20 e 80.

A proteína, poliol e metal, em conjunto com outros ingredientes, podem ser combinados numa única etapa ou em duas ou mais etapas. Preferentemente, a proteína é complexada com o metal anteriormente à adição do poliol. Por exemplo, a proteína, poliol, metal, e ingredientes opcionais podem ser misturados num tampão aquoso para formar uma solução, emulsão, ou suspensão. Tampões úteis incluem, por exemplo, tampões fosfato, Tris, citrato, succinato, acetato, e histidina. Tipicamente, o tampão encontra-se no intervalo de cerca de 2 mM até cerca de 100 mM. Tampões preferidos incluem tampões succinato de sódio e fosfato e potássio.

A formulação aquosa de proteína, poliol e metal pode ser utilizada para administrar a terapêutica à base de proteína, ou a formulação pode ser adicionalmente processada. Por exemplo, a formulação pode ser convertida num sólido através de liofilização ou secagem por congelação, ou pode ser incorporada num polímero bioerodível. Um polímero bioerodível decompõe-se quando colocado no interior de um organismo, conforme medido através de um declínio da massa molecular do polímero ao longo do tempo. As massas moleculares de polímeros podem ser determinadas através de uma variedade de métodos incluindo cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), e são geralmente expressas como médias de peso ou médias numéricas. Um polímero é bioerodível se, quando em solução salina tamponada com fosfato (PBS) de pH 7,4 e uma temperatura de 37 °C, a sua massa molecular média é reduzida por pelo menos 25% ao longo de um período de 6 meses conforme medido através de SEC. Polímeros bioerodíveis incluem poliésteres, tais como poli(caprolactona), poli(ácido glicólico), poli (ácido

lático), e poli(hidroxibutirato); polianidridos, tais como poli(anidrido adípico) e poli (anidrido maleico); polidioxanona; poliaminas; poliamidas; poliuretanos; poliesteramidas; poliortoésteres; poliacetais; policetais; policarbonatos; poliortocarbonatos; polifosfazenos; poli(ácido málico); poli(aminoácidos); polivinilpirrolidona; poli(éter vinil metílico); poli(oxalato de alquileno); poli(succinato de alquileno); polidroxicelulose; quitina; quitosana; e copolímeros e misturas dos mesmos. As proteínas podem ser incorporadas em polímeros bioerodíveis através da formação de implantes monolíticos, que são implantados cirurgicamente, ou através da formação de micropartículas do polímero bioerodível contendo a proteína.

A composição pode também incluir um líquido portador. Preferentemente, a formulação de proteína, poliol e metal pode ser misturada com um líquido portador para ser injetada num paciente; no entanto, qualquer ordem de mistura destes ingredientes é possível. Formulações sólidas e micropartículas podem também ser injetadas quando misturadas com um portador líquido. É preferido que a relação do volume do portador líquido para a massa combinada da proteína e do metal seja desde 99:1 até 70:30 p/v. Mais preferentemente, a relação do portador líquido para a proteína e o metal é desde 95:5 até 85:15 p/v. Para um implante administrado através de injeção, a mistura líquida transforma-se preferentemente num depósito após contactar com o fluido no corpo. Este depósito é caracterizado pela sua separação de fase a partir do fluido fisiológico e a sua viscosidade aumentada em relação à composição líquida original. É este depósito que serve para libertar controladamente a proteína.

O portador líquido pode ser um polímero bioerodível que solidifica após a administração. Alternativamente, o portador líquido pode ser um agente que proporciona um aumento da viscosidade após a administração. Exemplos destes agentes incluem ácido hialurónico, bem como acetato-isobutirato de

sacarose (SAIB) conforme utilizado no sistema SABER (SOUTHERN BIOSYSTEMS, Birmingham, AL). O sistema SABER é um sistema de administração de fármacos injetável que é composto por um material líquido não polimérico e um solvente orgânico (Patente U.S. N.º 5.747.058; Smith e Tipton (1996) Pharmaceutical Research 13(3):300). SABER é injetado como um líquido de baixa viscosidade cuja viscosidade aumenta rapidamente após a injeção. A matriz de viscosidade elevada resultante é adesiva, biodegradável e biocompatível.

O material líquido não polimérico do sistema SABER é um líquido não hidrossolúvel tendo uma viscosidade de pelo menos 5.000 centipoise (cP) a 37 °C que não cristaliza puro sob condições fisiológicas ambientais. A viscosidade do líquido pode ser medida utilizando um viscosímetro CANON-FENSKE a uma temperatura de 25 °C. A viscosidade cinemática da composição SABER, incluindo o material líquido e o solvente, é preferentemente menor do que 1000 cP à temperatura ambiente. Mais preferentemente, a viscosidade cinemática da composição SABER é menor do que 200 cP à temperatura ambiente. Materiais líquidos adequados incluem ésteres de estearato, amidas de estearato, amidas de ácidos gordos de cadeia longa, álcoois gordos de cadeia longa, ésteres de cadeia longa, e ésteres de dissacarídeo. Preferentemente, o material líquido é diestearato de sacarose acetilado, acetato-butirato de dissacarídeo, ou SAIB. A relação de peso de material líquido para solvente é preferentemente desde 50:50 até 85:15 p/p. Mais preferentemente, a relação de massa de material líquido para solvente é desde 50:50 até 70:30 p/p.

Estas formulações tipicamente incluem também um ou mais solventes orgânicos, tais como cloreto de metileno, acetato de etilo, sulfóxido de dimetilo (DMSO), tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), etanol (EtOH), N-metil pirrolidona (NMP), benzoato de benzilo, álcool benzílico, migliol e carbonato de propileno. A estabilidade de uma proteína na presença de um solvente orgânico é medida através da

recuperação da proteína a partir do solvente e da medição da percentagem da proteína que se encontra intacta (isto é, não desnaturada). A proteína que não se encontra desnaturada é referida como monómero, já que as proteínas desnaturadas têm tendência a agregar-se. A percentagem de monómero pode ser medida através de HPLC-SEC. Preferentemente, a percentagem de monómero recuperado é desde 35% até 100%. Mais preferentemente, a percentagem de monómero recuperado é desde 70% até 100%. Ainda mais preferentemente, a percentagem de monómero recuperado é desde 90% até 100%. Ainda mais preferentemente, a percentagem de monómero recuperado é desde 95% até 100%. Ainda mais preferentemente, a percentagem de monómero recuperado é desde 99% até 100%.

Quando a composição é administrada *in vivo*, preferentemente menos de 10% da proteína é libertada a partir do depósito no prazo de 24 horas após a administração, mais preferentemente menos de 5% da proteína é libertada a partir do depósito no prazo de 24 horas após a administração, ainda mais preferentemente menos de 1 % da proteína é libertada a partir do depósito no prazo de 24 horas após a administração, ainda mais preferentemente menos de 0,2% da proteína é libertada a partir do depósito no prazo de 24 horas após a administração, ainda mais preferentemente menos de 0,01% da proteína é libertada a partir do depósito no prazo de 24 horas após a administração. O organismo ao qual a composição é administrada pode ser, por exemplo, um rato ou um ser humano.

A libertação da proteína ocorre preferentemente sobre um período de dias, semanas, ou meses. É preferível que pelo menos 25% da quantidade total de proteína seja libertada no prazo de um ano após a administração, mais preferentemente pelo menos 25% da quantidade total de proteína é libertada no prazo de um mês após a administração, mais preferentemente pelo menos 25% da quantidade total de proteína é libertada no prazo de uma semana após a administração. Alternativamente, é preferível que pelo menos 20% da quantidade total de proteína seja

libertada no prazo de um ano após a administração, mais preferentemente pelo menos 20% da quantidade total de proteína é libertada no prazo de um mês após a administração, mais preferentemente pelo menos 20% da quantidade total de proteína é libertada no prazo de uma semana após a administração. O comprimento desejado do período de libertação variará de acoro com o tratamento fisiológico desejado. É preferido que a quantidade de proteína libertada no prazo de um período de 24 horas seja desde 0,01% até 5%. Mais preferentemente, a quantidade de proteína libertada no prazo de um período de 24 horas é desde 0,05% até 3%. Ainda mais preferentemente, a quantidade de proteína libertada no prazo de um período de 24 horas é desde 1% até 3%.

A composição pode ser convenientemente embalada num recipiente estéril, tal como o frasco 10 ilustrado na Figura 1. Este recipiente pode formar parte de um *kit* que pode opcionalmente conter uma seringa e agulha estéreis. O frasco 10 pode ser selado com um septo 12. Este septo sela o líquido 14 e pode ser perfurado por uma agulha e seringa para permitir a remoção da mistura. O frasco pode conter todos os ingredientes necessários para a libertação controlada da proteína. A composição líquida no frasco contém preferentemente uma dosagem unitária da proteína. É preferido que não seja requerido ao utilizador final da mistura adicionar ingredientes adicionais ou medir a dosagem anteriormente à administração. A composição líquida pode ser contida numa seringa de forma a ser diretamente administrada através de injeção.

Alternativamente, a composição pode ser embalada em mais de um recipiente. Por exemplo, um portador líquido pode encontrar-se num frasco, e uma mistura da proteína num solvente ou mistura de solventes pode encontrar-se noutro frasco. Os solventes e/ou solvente podem ser iguais ou diferentes do portador líquido. O conteúdo dos frascos pode ser combinado e misturado, e a composição final administrada através de

injeção. Noutro exemplo, a formulação da proteína, poliol e metal pode encontrar-se num recipiente, e o portador líquido pode encontrar-se noutro recipiente. A proteína, poliol e metal podem ser proporcionados em conjunto como um pó, ou a proteína, poliol e metal podem ser proporcionados em conjunto como um comprimido ou cápsula. A proteína, poliol e metal podem ser combinados com o portador líquido, e a composição final administrada através de injeção. Noutro exemplo, o poliol e metal podem ser proporcionados como uma mistura no portador líquido num frasco, e a proteína pode ser proporcionada num recipiente separado. Alternativamente, a proteína pode ser proporcionada como uma mistura no portador líquido num frasco, e o poliol e metal podem ser proporcionados num recipiente separado. O conteúdo dos recipientes pode ser combinado para que seja formada uma formulação líquida, e a composição final administrada através de injeção.

Preferentemente, a embalagem da composição ou dos seus componentes é descartável, mais preferentemente reciclável. É preferido que a composição e a sua embalagem sejam estéreis.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Formulações proteicas estáveis

Uma formulação sólida de hormona do crescimento foi produzida através da combinação de rhGH (GENENTECH, S. São Francisco, CA) em bicarbonato de sódio a 25 mM (25 mg rhGH /ml) com acetato de zinco para proporcionar uma relação molar 10:1 de zinco para hormona do crescimento. Nas formulações 2 e 5, o poliol foi adicionado a esta mistura à concentração indicada. Nas formulações 3 e 4, não foi adicionado qualquer zinco antes ou depois da adição do poliol. Na formulação 1, não foi adicionado qualquer poliol à mistura de rhGH e zinco.

O efeito de solventes orgânicos na estabilidade da proteína foi determinado através da adição de formulação sólida de rhGH (1,0 mg) quer a etanol absoluto (EtOH) quer a N-metil pirrolidina (NMP). A relação de massa proteica (mg) para volume de solvente (ml) foi 5 mg/ml. Após a adição da proteína, as

amostras foram homogeneizadas durante 2 min a 8.000 rpm com uma ponta de homogeneizador de cisalhamento. As suspensões resultantes foram deixadas incubar a 37 °C durante 24 horas. A rhGH foi recuperada através de diluição num excesso de 10 vezes de um tampão de estabilização (EDTA a 5 mM, HEPES a 50 mM, NaN_3 a 0.01%, pH 8,0). A quantidade e qualidade da proteína recuperada nesta etapa foi determinada através de cromatografia de exclusão de tamanho-cromatografia líquida de alto desempenho (SEC-HPLC), e os resultados são mostrados no Quadro 1. A SEC-HPLC foi feita correr utilizando uma coluna TSK 2000-SWXL de 7,8 X 300 mm à temperatura ambiente, com uma fase móvel de NaH_2PO_4 a 50mM, NaCl a 150 mM, pH 7,2. A taxa de fluxo foi 1,0 ml/min, e o tempo de corrida foi 20 min. Foi injetada proteína (20 mg) e o eluente monitorizado quanto a absorvância a 214 nm.

Os critérios para uma formulação estável foram recuperação máxima de rhGH monomérica sem formação de agregados. Foram analisadas amostras de controlo de cada formulação através de incubação no tampão sem exposição a um solvente orgânico, e os resultados indicam que o material de partida para cada formulação não conteve quantidades significativas de agregado.

A presença de um poliol e zinco proporcionam proteção superior contra a desnaturação proteica após exposição a etanol e NMP. Formulações contendo tanto um poliol como zinco produziram recuperação mais elevada de monómero que formulações estabilizadas com somente um poliol ou somente zinco.

Quadro 1. Efeito de solventes orgânicos sobre a estabilidade de rhGH

Formulação	Concentração de Poliol (% em p)		Zinco:rhGH (relação molar)	% Monómero Recuperado (Média ± DP)		% Monómero Recuperado (Controlo)
	Manitol	Trealose		EtOH	NMP	
1	0	0	10:1	31 ± 8	37 ± 3	98

2	1	0	10:1	36 ± 1	44 ± 1	98
3	1	0	0	22 ± 1	19 ± 1	98
4	0	5	0	65 ± 1	88 ± 1	99
5	0	5	10:1	72 ± 1	89 ± 0	99

Exemplo 2 - Formulação de libertação controlada

Foram produzidas formulações sólidas de hormona do crescimento através da combinação de rhGH com zinco e/ou um poliol. Nas formulações 12-20, rgGH em bicarbonato de sódio a 25 mM (20 mg rhGH /ml) foi combinada com acetato de zinco para proporcionar uma relação molar de 10:1 de zinco para hormona do crescimento. Nas formulações 12-19, o poliol foi então adicionado à mistura à concentração indicada. As formulações 13 e 17 incluíram adicionalmente POLYSORBATE 20 a 0,02%, que foi adicionado com o poliol. Nas formulações 6-11, o poliol foi adicionado à mistura de rhGH sem a adição de zinco.

O efeito de poliol e zinco na estabilidade da proteína num sistema de libertação controlada foi determinado através da adição de formulação de rhGH em SABER (100 µl) em 2 ml de tampão de libertação. A formulação conteve uma carga de rhGH a 5% numa mistura 80:20 de SAIB e álcool benzílico. O tampão foi HEPES a 50 mM, KCl a 95 mM, pH 7,2. As suspensões resultantes foram armazenadas a 37 °C durante 24 horas. A quantidade e qualidade da proteína recuperada nesta etapa foi determinada através de SEC-HPLC, e os resultados são proporcionados no Quadro 2. O meio de libertação total foi analisado através de SEC-HPLC para determinar o teor de proteína total e a percentagem de proteína não agregada presente, utilizando um método semelhante ao descrito em Maa *et. al*. J. Pharm Sci. 2(87) 152-159, 1998.

Formulações contendo somente um poliol ou somente zinco permitiram desnaturação proteica significativa, com um máximo de 91,5% de recuperação de monómero. A presença tanto de um poliol como de zinco protegeu eficazmente a proteína da desnaturação. Estas formulações proporcionaram aproximadamente 99% de recuperação de monómero. A combinação

de poliol e zinco permite também taxas de libertação aceitáveis da proteína a partir do depósito, com libertações de 24 horas entre 10 e 15%.

Quadro 2

Formulação	Concentração de Poliol		Relação Molar Zinco: rhGH	% Libertado		% Monómero Recuperado
	Manitol	Trealose		1 dia	DP	
6	1	0	0	17	5,9	85,4
7	5	0	0	8	0,1	89,7
8	10	0	0	36	0,04	74,7
9	0	1	0	15	0,2	83,4
10	0	5	0	6	0,7	90,5
11	0	10	0	6	0,2	91,5
12	1	0	10:1	12	0,6	98,8
13	1*	0	10:1	10	3,2	99,1
14	5	0	10:1	12	1,0	99,2
15	10	0	10:1	10	0,3	99,2
16	0	1	10:1	10	0,01	98,9
17	0	1*	10:1	10	0,9	98,9
18	0	5	10:1	15	2,2	99,2
19	0	10	10:1	14	1,4	99,2
20	0	0	10:1	12	1,2	83,9
21	0	0	0	10	5,3	91,1
* Formulado adicionalmente com tensioativo POLYSORBATE 20 a 0,02%						

Obviamente, várias modificações e variações da presente invenção são possíveis à luz dos ensinamentos acima. Deve como tal ser entendido que dentro do âmbito das reivindicações anexas, a invenção pode ser posta em prática de outra forma para além da especificamente descrita no presente documento nos Exemplos.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do Patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 5096885 A **[0003]**
- US 4297344 A **[0003]**
- US 5589167 A **[0003]**
- WO 8903671 A **[0003]**
- US 6191107 B1 **[0003]**
- US 5747058 A **[0025]**

Documentos de não patente citados na descrição

- *Pharm. Res.*, 1991, vol. 8, 285-291 **[0003]**
- **GRAY et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 7380-7384 **[0018]**
- **KOHNO et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 8331-8335 **[0018]**
- **SMITH; TIPTON.** *Pharmaceutical Research*, 1996, vol. 13 (3), 300 **[0025]**
- **MAA.** *J. Pharm Sci.*, 1998, vol. 2 (87), 152-159 **[0038]**

Lisboa, 24 de Novembro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição, compreendendo:
uma proteína, em que a proteína é hormona do crescimento humana recombinante;
um poliol; e
um catião metálico, em que o catião metálico é zinco divalente;
em que a relação de massa de poliol para proteína é desde 1:1 até 1:100, e a relação de massa de zinco para proteína é desde 1:1 até 100:1 e em que o poliol e zinco em conjunto proporcionam uma proteção sinérgica da conformação e atividade da proteína, e compreendendo adicionalmente um solvente orgânico.

2. A composição da reivindicação 1, em que:
(a) o dito poliol é selecionado a partir do grupo que consiste num monossacarídeo, um polissacarídeo, glicerol, manitol, sorbitol, inositol e polietilenoglicol; ou
(b) o dito poliol é selecionado a partir do grupo que consiste em manitol, trealose e polietilenoglicol.

3. A composição da reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que a relação de massa de poliol para proteína é desde 1:1 até 1:10.

4. A composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que:
(a) a relação molar de zinco para proteína é desde 1:1 até 20:1; ou
(b) a relação molar de zinco para proteína é desde 1:1 até 10:1.

5. A composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, compreendendo adicionalmente um material portador;

em que o material portador compreende um material líquido não polimérico, não hidrossolúvel tendo uma viscosidade de pelo menos 5.000 cP a 37 °C que não cristaliza puro sob condições fisiológicas ambientais.

6. A composição da reivindicação 5, em que o material líquido é um éster de estearato, uma amida de estearato, uma amida de ácido gordo de cadeia longa, um álcool gordo de cadeia longa, um éster de cadeia longa ou um éster de dissacarídeo.

7. A composição da reivindicação 5, em que o material líquido é diestearato de sacarose acetilado ou o material líquido é acetato-butirato de dissacarídeo ou o material líquido é acetato-isobutirato de sacarose.

8. A composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que:

(a) a composição tem uma viscosidade menor do que 1000 cP à temperatura ambiente; ou

(b) a composição tem uma viscosidade menor do que 200 cP à temperatura ambiente;

9. Utilização de uma composição para a preparação de uma formulação compreendendo adicionalmente um solvente orgânico, em que a composição compreende:

uma proteína, em que a proteína é hormona do crescimento humana recombinante;

um poliol; e

um catião metálico, em que o catião metálico é zinco divalente;

em que a relação de massa de poliol para proteína é desde 1:1 até 1:100, e a relação de massa de zinco para proteína é desde 1:1 até 100:1 e em que o poliol e zinco em conjunto proporcionam uma proteção sinérgica da conformação e atividade da proteína.

10. A utilização da reivindicação 9, em que
(a) o dito poliol é selecionado a partir do grupo que consiste num monossacarídeo, um polissacarídeo, glicerol, manitol, sorbitol, inositol, e polietilenoglicol; ou
(b) o dito poliol é selecionado a partir do grupo consistindo em manitol, trealose e polietilenoglicol.

11. A utilização da reivindicação 9 ou reivindicação 10, em que a relação de massa de poliol para proteína é desde 1:1 até 1:10.

12. A utilização de qualquer uma das reivindicações 9 a 11, em que:
(a) a relação molar de zinco para proteína é desde 1:1 até 20:1; ou
(b) a relação molar de zinco para proteína é desde 1:1 até 10:1.

13. A utilização de qualquer uma das reivindicações 9 a 12, que compreende adicionalmente um material portador;
em que o material portador compreende um material líquido não polimérico, não hidrossolúvel tendo uma viscosidade de pelo menos 5.000 cP a 37 °C que não cristaliza puro sob condições fisiológicas ambientais.

14. A utilização da reivindicação 13, em que o material líquido é um éster de estearato, uma amida de estearato, uma amida de ácido gordo de cadeia longa, um álcool gordo de cadeia longa, um éster de cadeia longa, ou um éster de dissacarídeo.

15. A utilização da reivindicação 13, em que o material líquido é diestearato de sacarose acetilado ou o material líquido é acetato-butirato de dissacarídeo ou o material líquido é acetato-isobutirato de sacarose.

16. A utilização de qualquer uma das reivindicações 9 a 15, em que:

(a) a composição tem uma viscosidade menor do que 1000 cP à temperatura ambiente; ou

(b) a composição tem uma viscosidade menor do que 200 cP à temperatura ambiente;

17. Utilização de uma composição de qualquer uma das reivindicações 5 a 7 para a preparação de uma formulação de libertação sustentada, em que o poliol e zinco em conjunto proporcionam uma proteção sinérgica da conformação e atividade da proteína.

18. Utilização de uma composição da reivindicação 17, em que entre 10 e 15% da proteína é libertada no prazo de 24 horas após a administração.

19. Um método de fabricar uma composição de libertação sustentada, compreendendo:

misturar uma composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e um portador líquido para formar a dita composição de libertação sustentada;

em que o dito portador líquido compreende acetato-isobutirato de sacarose.

20. O método da reivindicação 19, em que:

(a) a dita composição de libertação sustentada tem uma viscosidade menor do que 1000 cP à temperatura ambiente; ou

(b) a dita composição de libertação sustentada tem uma viscosidade menor do que 200 cP à temperatura ambiente.

21. O método da reivindicação 19 ou 20, em que o dito solvente é etanol, benzoato de benzilo, migliol, carbonato de propileno ou álcool benzílico.

22. O método da reivindicação 21, em que:
(a) a relação de acetato-isobutirato de sacarose para solvente é desde 50:50 p/p até 85:15 p/p; ou
(b) a relação de acetato-isobutirato de sacarose para solvente é desde 50:50 p/p até 70:30 p/p;

23. Um *kit*, compreendendo:
um recipiente;
uma composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 4; e
um portador líquido;
em que o portador líquido compreende acetato-isobutirato de sacarose.

24. O *kit* da reivindicação 23, compreendendo uma dosagem unitária da proteína.

25. O *kit* da reivindicação 23 ou reivindicação 24, em que o poliol, o catião metálico e o portador líquido são estéreis.

26. O *kit* de qualquer uma das reivindicações 23 a 25, compreendendo adicionalmente uma seringa.

27. O *kit* de qualquer uma das reivindicações 23 a 26, em que o *kit* compreende um septo.

Lisboa, 24 de Novembro de 2015

FIG. 1

