

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI 0715469-0 A2



(22) Data de Depósito: 11/07/2007
(43) Data da Publicação: 12/03/2013
(RPI 2201)

(51) Int.CI.:
A61K 38/00

(54) Título: COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA A LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE PEPTÍDEOS

(30) Prioridade Unionista: 11/07/2006 US 60830011

(73) Titular(es): Qps,Llc

(72) Inventor(es): Benjamin Chien, Yuhua Li

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT US2007015770 de
11/07/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/008363de
17/01/2008

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE PEPTÍDEOS. A presente invenção fornece métodos de formação de um implante sólido, biodegradável in-situ em um corpo por administração de uma composição líquida farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de um polímero biodegradável biocompatível, insolúvel em água e uma quantidade eficaz de um peptídeo terapêutico covalentemente modificado com uma ou mais porções lipofílicas ou anfifílicas, que são dissolvidos ou dispersos em um solvente orgânico biocompatível, hidrossolúvel. Essa invenção também fornece composições e métodos relacionados.

**COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE
PEPTÍDEOS**

Pedidos relacionados

Esse pedido reivindica prioridade de Pedido Provisório 5 U.S. No. 60/830.011, depositado em 11 de julho de 2006, cujo conteúdo é incorporado nesse pedido por referência.

Por todo este pedido, várias publicações são citadas. A revelação dessas publicações é aqui incorporada por referência nesse pedido para descrever mais completamente o 10 estado da técnica à qual essa invenção pertence.

Fundamento da invenção

1. Campo da invenção

Essa invenção relaciona-se ao campo de liberação controlada de peptídeos terapêuticos e a composições e 15 métodos úteis para liberação controlada de peptídeos terapêuticos covalentemente modificados com uma ou mais moléculas lipofílicas ou anfifílicas.

2. Descrição da técnica relacionada

Peptídeos, alternativamente referidos como 20 oligopeptídeos, polipeptídeos e proteínas, têm sido amplamente usados como agentes terapêuticos. Os peptídeos podem ser convenientemente produzidos por tecnologia de DNA recombinante ou podem ser sintetizados por tecnologia de síntese de peptídeos bem estabelecida. No entanto, vários 25 peptídeos são suscetíveis à degradação enzimática e têm uma meia-vida circulante *in vivo* muito curta. Portanto, a maior parte dos fármacos de peptídeo têm sido administrados por injeção, tipicamente múltiplas vezes por dia. Seria extremamente benéfico se tais peptídeos pudesse ser 30 liberados em uma maneira controlada por períodos estendidos

de tempo para melhorar a segurança, eficácia e adaptação do paciente.

Polímeros biodegradáveis têm sido usados para liberação sustentada de peptídeos terapêuticos. O peptídeo 5 é geralmente incorporado na composição polimérica e formado nos formatos desejados como barras, wafers e micropartículas fora do corpo. Essas composições sólidas podem ser então inseridas no corpo através de uma incisão ou injeção. Alternativamente e preferivelmente, algumas das 10 composições poliméricas podem ser injetadas no corpo como uma composição polimérica líquida para formar um implante *in situ*. Composições poliméricas biodegradáveis líquidas injetáveis para formação de implantes *in situ* para liberar fármacos em uma maneira controlada são descritas na 15 literatura de patentes. Acredita-se que as referências a seguir sejam representativas nessa área e são aqui incorporadas por referência: Pat. U.S. Nos. 6.565.874; 6.528.080; RE37. 950; 6.461.631; 6.395.293; 6.355.657; 6.261.583; 6.143.314; 5.990.194; 5.945.115; 5.792.469; 20 5.780.044; 5.759.563; 5.744.153; 5.739.176; 5.736.152; 5.733.950; 5.702.716; 5.681.873; 5.599.552; 5.487.897; 5.340.849; 5.324.519; 5.278.202; 5.278.201; e 4.938.763. Como aqui descrito, um agente bioativo é dissolvido ou disperso em uma solução de polímero biodegradável em um 25 solvente orgânico biocompatível para fornecer uma composição líquida. Quando a composição líquida é injetada no corpo, o solvente se dissipa no ambiente aquoso circundante, e o polímero precipita para formar um depósito sólido ou em gel do qual o agente bioativo é liberado por 30 um longo período de tempo à medida que o polímero se

degrada. O uso de tal sistema de liberação foi exemplificado na liberação de acetato de leuprolide para tratar câncer de próstata avançado (EligardTM). Não obstante algum sucesso, aqueles métodos não foram inteiramente satisfatórios para um grande número de peptídeos que podem ser liberados de forma eficaz por tal abordagem.

Para vários peptídeos terapêuticos, a acilação e/ou degradação dos peptídeos encapsulados em microesferas de poli(DL-lactide-co-glicolídeo) foi observada durante o processo de liberação [por exemplo, Na DH, Youn YS, Lee SD, Son MO, Kim WA, DeLuca PP, Lee KC. *J Control Release*. 2003; 92(3):291-9]. Os grupos funcionais nucleofílicos nos peptídeos podem não apenas reagir com o polímero biodegradável, mas também podem catalisar a degradação do polímero biodegradável. Também foi constatado que a acilação e/ou degradação pode ocorrer muito mais rapidamente em solução de polímero que no estado sólido. Por exemplo, quando acetato de octreotida foi misturado com 50/50 poli(DL-lactide-co-glicolídeo) tendo uma solução de grupo terminal carboxi em NMP, mais de 80% de octreotida foi acilado e/ou degradado em 24 horas. A interação/reação entre o peptídeo e polímero ou seus produtos de degradação pode ocorrer durante a formulação, estocagem e administração. Portanto, para manter a estabilidade das formulações, o peptídeo é tipicamente suprido em uma seringa separada enquanto o restante dos componentes é embalado em uma outra seringa. Os conteúdos nas seringas são misturados logo antes do uso. No entanto, por causa da natureza viscosa das formulações de polímero, é

freqüentemente difícil misturar os conteúdos em duas seringas separadas pelos usuários finais. A uniformidade das formulações preparadas pelo usuário final pode variar significativamente, também pode ocorrer contaminação e, 5 portanto, a qualidade do tratamento pode ser comprometida significativamente. Além disso, a formação *in-situ* do implante sólido a partir da formulação de polímero líquida injetável é um processo lento. Tipicamente o processo de dissipaçāo/difusão do solvente pode levar algumas horas a 10 vários dias ou mesmo mais dependendo do solvente usado. Durante esse período, a presença de solvente orgânico pode promover a interaçāo/reacção entre peptídeo e polímero ou seus produtos de degradaçāo.

Em adiçāo, durante a formação do implante, a taxa de 15 difusão do peptídeo a partir da composição polimérica de coagulação pode ser muito mais rápida que a taxa de liberação que ocorre a partir do implante sólido subseqüentemente formado. Essa liberação inicial "em explosão" do peptídeo durante a formação do implante pode 20 resultar na perda ou liberação de uma grande quantidade dos peptídeos terapêuticos. Se o peptídeo é particularmente tóxico ou tem uma janela terapêutica estreita, essa liberação inicial ou explosão provavelmente leva a efeitos colaterais tóxicos e pode danificar tecidos adjacentes. 25 Portanto, o processo de formação de implante sólido e a instabilidade do agente bioativos e/ou excipientes representam um desafio muito significante para o uso desse tipo de formulações para liberação sustentada de peptídeos terapêuticos.

30 A modificaçāo covalente de peptídeos com moléculas

lipofílicas, como ácidos graxos, foi descrita por melhorar a eficácia terapêutica pelo aumento da meia-vida circulante *in vivo* através de ligação a albumina. [EP0708179-A2, EP0699686-A2, US 6268343, Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NL, Madsen K, Pedersen FZ, Thogersen H, Wilken M, Agerso H. Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J Med Chem.* 2000, 43(9):1664-9; Kurtzhals P, Havelund S, Jonassen I, Kiehr B, Larsen UD, Ribel U, Markussen J. Albumin binding of insulins acilada with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect *in vivo*. *Biochem J.* 1995;312 (3):725-31, e referências aqui citadas]. Embora os peptídeos lipofilicamente modificados mostrem ação prolongada *in vivo* comparados com os peptídeos nativos, o tempo e residência no plasma dos peptídeos modificados é limitado por sua afinidade de ligação à albumina. Um exemplo bem sucedido é uma insulina acilada (Detemir) que tem uma meia-vida circulante de $10,2 \pm 1,2$ h. [Havelund S, Plum A, Ribel U, Jonassen I, Vølund A, Markussen J and Kurtzhals P, *Pharmaceutical Research*, 2004; 21 (8), 1498-1504]. Esse produto foi aprovado para injeção para tratar pacientes com diabetes tipo I. No entanto, ele ainda precisa ser administrado a pacientes todos os dias. Portanto, há uma grande necessidade por uma composição estável em que a taxa de liberação de certos peptídeos possa ser mais facilmente controlada, especialmente para um peptídeo que requer liberação sustentada por um longo período de tempo.

30 Sumário da invenção

Foi constatado de forma inesperada que peptídeos covalentemente modificados com uma ou mais moléculas lipofílicas e/ou anfifílicas podem ser formuladas com polímeros biodegradáveis que resultam em estabilidade e 5 perfis liberação sustentada significativamente melhorados em relação a peptídeos não conjugados. Peptídeos modificados Lipofilicamente e/ou anfifilicamente podem não apenas evitar a acilação aleatória descontrolada e degradação dos peptídeos durante a formulação, estocagem e 10 subseqüentes processos de liberação *in vivo*, mas também podem reduzir a liberação de peptídeos em explosão inicial indesejada. Tais sistemas de liberação permitem que maiores concentrações de um peptídeo terapêutico sejam incorporadas de modo seguro em um sistema de liberação de polímero 15 biodegradável. A eficácia de tais produtos é também melhorada, uma vez que uma percentagem muito maior de peptídeo ativo intacto permanece no sistema de liberação para liberação sustentada e não é perdida por degradação durante a formulação, estocagem, administração and 20 subseqüente liberação *in vivo*.

Portanto, a presente invenção fornece novas formulações farmacêuticas para liberação controlada, sustentada de peptídeos terapêuticos. As composições da presente invenção compreendem (a) um peptídeo que é 25 covalentemente conjugado com uma ou mais moléculas lipofílicas; (b) um polímero biodegradável; e (c) um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável. Os peptídeos são covalentemente conjugados com uma ou mais moléculas lipofílicas de tal modo que o peptídeo conjugado retém a 30 maior parte ou todas as atividades biológicas do peptídeo

não conjugado embora ele tenha uma resistência química aumentada à reação com o polímero biodegradável tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em relação ao peptídeo não conjugado. O peptídeo lipofilicamente modificado é então formulado por 5 dissolução ou dispersão em uma solução de polímero biodegradável com o uso de um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável. As formulações da presente invenção não apenas melhoram a estabilidade do peptídeo durante a formulação, estocagem, administração e 10 subseqüente liberação, mas também melhoram seus perfis de liberação com menores níveis de explosão inicial e duração sustentada.

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição que compreende (a) um peptídeo que é 15 covalentemente conjugado com uma ou mais porções anfifílicas; (b) um polímero biodegradável; and (c) um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável. Os peptídeos são covalentemente conjugados com uma ou mais porções anfifílicas em tal maneira que o peptídeo conjugado retém a 20 maior parte ou todas as atividades biológicas do peptídeo não conjugado embora ele tenha uma resistência química aumentada à reação com o polímero biodegradável tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em relação ao peptídeo não conjugado. O peptídeo anfifilicamente modificado é então formulado por 25 dissolução ou dispersão em uma solução de polímero biodegradável com o uso de um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável. As formulações da presente invenção não apenas melhoram a estabilidade do peptídeo durante a formulação, estocagem, administração e 30 subseqüente liberação, mas também melhoram seus perfis de

liberação com menores níveis de explosão inicial e duração sustentada. O peptídeo conjugado também reduz a degradação catalisada do polímero por grupos nucleofílicos do peptídeo.

5 Cada uma das composições da presente invenção pode ser um líquido viscoso ou não viscoso, gel ou semi-sólido que se move como um fluido de modo que ele possa ser injetado com o uso de uma seringa. Cada composição pode ser formada com uma matriz polimérica implantável *in vitro*, ou
10 alternativamente, ela pode ser formada *in-situ* nas formas de um gel ou um implante sólido. As composições podem ser administradas por injeção e/ou implante subcutâneo, intramuscular, intraperitoneal, ou intradérmico. Quando administrado a um indivíduo, a liberação controlada do
15 peptídeo pode ser sustentada por um período de tempo desejado dependendo da composição do implante. Com as seleções do polímero biodegradável e de outros excipientes, a duração da liberação sustentada do peptídeo pode ser controlada por um período de tempo de várias semanas a um
20 ano.

As várias características de inovação que caracterizam a invenção são apontadas com particularidade nas reivindicações em anexo e formam parte da revelação. Para uma melhor compreensão da invenção, suas vantagens de
25 operação, e objetivos específicos alcançados pelo seu uso, deve ser feita referência ao desenho e matéria descritiva em que são ilustradas e descritas modalidades preferidas da invenção.

Breve descrição dos desenhos

30 Figura 1. Liberação *in vitro* de lisozima e lisozima

acilada por ácido palmítico de formulações em solução RG503H em mPEG350.

Figura 2. Liberação *in vitro* de grelina e grelina desacilada de formulações em solução RG503H em mPEG350.

5 Figura 3. Liberação *in vitro* de octreotida de formulação em solução DLPLG85/15 (IV 0,28) em NMP.

Figura 4. Liberação *in vitro* de octreotida modificado (Pal-PEG-BA-OCT) de formulação em solução DLPLG85/15 (IV 0,28) em NMP.

10 Descrição detalhada das modalidades atualmente preferidas

A presente invenção fornece composições poliméricas biodegradáveis líquidas injetáveis para formação de um sistema de liberação controlada para peptídeos. A presente invenção também fornece um método de manufatura e um método 15 de uso desse.

As composições da presente invenção compreendem (a) um peptídeo que é conjugado, preferivelmente covalentemente, com uma ou mais lipofílicas moléculas; (b) um polímero biodegradável, insolúvel em água, farmaceuticamente aceitável; e (c) um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável. Os peptídeos são covalentemente conjugados com uma ou mais lipofílicas moléculas de tal modo que o peptídeo conjugado retém a maior parte ou todas as atividades biológicas do peptídeo não conjugado embora ele 25 tenha uma resistência química aumentada à reação com o polímero biodegradável tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em relação ao peptídeo não conjugado. O peptídeo lipofilicamente modificado é então formulado por dissolução ou dispersão em uma solução de polímero biodegradável com o 30 uso de um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável. As

formulações da presente invenção não apenas melhoram a estabilidade do peptídeo durante a formulação, estocagem, administração e subsequente liberação, mas também melhoram seus perfis de liberação com menores níveis de explosão 5 inicial e duração sustentada.

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição que compreende (a) um peptídeo que é conjugado, preferivelmente covalentemente, com uma ou mais moléculas anfifílicas; (b) um polímero biodegradável, insolúvel em 10 água, farmaceuticamente aceitável; e (c) um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável. Os peptídeos são covalentemente conjugados com uma ou mais moléculas anfifílicas de tal modo que o peptídeo conjugado retém a maior parte ou todas as atividades biológicas do peptídeo 15 não conjugado embora ele tenha uma resistência química aumentada à reação com o polímero biodegradável tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em relação ao peptídeo não conjugado. O peptídeo anfifilicamente modificado é então formulado por dissolução ou dispersão em uma solução de polímero 20 biodegradável com o uso de um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável. As formulações da presente invenção não apenas melhoram a estabilidade do peptídeo durante a formulação, estocagem, administração e subsequente liberação, mas também melhoram seus perfis de 25 liberação com menores níveis de explosão inicial e duração sustentada. O peptídeo conjugado também reduz a degradação catalisada do polímero por grupos nucleofílicos do peptídeo.

Como aqui usado, os termos "um" e "uma" devem ser 30 interpretados como "um ou mais" e "pelo menos um".

O termo "peptídeo" é usado como um sinônimo para "polipeptídeo" e "proteína." Exemplos não limitantes de propriedades terapêuticas que um peptídeo pode possuir incluem propriedades antimetabólica, antifúngica, 5 antiinflamatória, antitumoral, anti-infecciosa, antibiótica, nutriente, agonista, e antagonista.

Mais especificamente, os peptídeos da invenção podem ser covalentemente modificados com moléculas lipofílicas ou anfifílicas. Os peptídeos preferivelmente contêm um ou mais 10 grupos funcionais modificáveis. Peptídeos úteis na preparação das formulações da invenção incluem, sem limitação, ocitocina, vasopressina, hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de 15 plaquetas (PDGF), prolactina, hormônios como hormônio luteinizante, hormônio de liberação de hormônio luteinizante (LHRH), agonistas de LHRH, antagonistas de LHRH, hormônios do crescimento, fator de liberação do hormônio do crescimento, insulina, eritropoietina, 20 somatostatina, glucagon, interleucina, interferon-alfa, interferon-beta, interferon-gama, gastrina, tetragastrina, pentagastrina, urogastrona, secretina, calcitonina, encefalinas, endorfinas, angiotensinas, hormônio de liberação de tireotrofinas (TRH), fator de necrose 25 tumoral (TNF), hormônio da paratireóide (PTH), fator de crescimento de nervo (NGF), fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônia de granulócitos macrófagos (GM-CSF), fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), heparinase, fator de 30 crescimento endotelial vascular (VEG-F), proteína

morfogênica óssea (BMP), hANP, peptídeo semelhante a glucagon (GLP-1), exenatida, peptídeo YY (PYY), grelina, renina, bradiquinina, bacitracinas, polimixinas, colistinas, tirocidina, gramicidinas, ciclosporinas, 5 enzimas, citocinas, anticorpos, vacinas, antibióticos, anticorpos, glicoproteínas, hormônio folículo-estimulante, quiotorfina, taftsina, timopoietina, timosina, timoestimulina, fator humorai tímico, fator humorai tímico sérico, fatores estimulantes de colônia, motilina, 10 bombesina, dinorfina, neurotensina, ceruleina, uroquinase, calikreina, análogos e antagonistas de substância P, angiotensina II, fatores de coagulação sangüínea VII e IX, lisozima, gramicidinas, hormônio estimulante de melanócitos, hormônio de liberação de hormônio da tireóide, 15 hormônio estimulante da tireóide, pancreozimina, colecistoquinina, lactogênio placentário humano, gonadotrofina coriônica humana, peptídeo estimulante da síntese de proteína, peptídeo inibidor gástrico, peptídeo intestinal vasoativo, fator de crescimento derivado de 20 plaquetas, hormônios pigmentares, somatomedina, gonadotrofina coriônica, fatores de liberação hipotalâmicos, hormônios antidiuréticos, hormônio estimulante da tireóide, bifalina e prolactina.

Como aqui usado, o termo "porções lipofílicas" 25 referem-se a qualquer porção que tenha características lipofílicas e que tenha uma solubilidade em água a 20°C de menos que 5 mg/ml, preferivelmente menos que 0,5 mg/ml. Tal porção lipofílica é tipicamente selecionada de C₃₋₃₉-alquil, C₃₋₃₉-alquenil, C₃₋₃₉-alcadienil, tocoferol e resíduos 30 esteróides. Os termos "C₃₋₃₉-alquil", "C₃₋₃₉-alquenil" e "C₃₋

39-alcadienil" devem abranger hidrocarbonetos de cadeia linear e ramificada, preferivelmente de cadeia linear, saturados, monoinsaturados e di-insaturados de 3-39 átomos de carbono.

5 A conjugação covalente de uma porção lipofílica a um peptídeo leva a um peptídeo lipofilicamente modificado que pode ter um melhor efeito terapêutico comparado com o peptídeo nativo. Isso pode ser feito tipicamente por reação de um grupo funcional como um grupo amina em um peptídeo 10 com um ácido ou outros grupos reativos em uma molécula lipofílica. Alternativamente, a conjugação entre peptídeo e molécula lipofílica é realizada através de uma porção adicional como uma ponte, espaçador, ou porção de ligação, que podem ser degradáveis ou não degradáveis. Alguns 15 exemplos são revelados na técnica prévia [por exemplo, insulinas aciladas por ácido graxo são descritas no Pedido de Patente Japonesa 1.254.699. Veja também, Hashimoto, M., e cols., *Pharmaceutical Research*, 6:171-176 (1989), e Lindsay, D. G., e cols., *Biochemical J.*, 121:737-745 20 (1971)]. Mais descobertas de insulinas aciladas por ácido graxo e análogos de, e dos métodos para sua síntese, são encontradas na Pat. U.S. No. 5.693.609, WO95/07931, Pat. U.S. No. 5.750.497, e WO96/29342. Exemplos adicionais de 25 peptídeos acilados são encontrados em WO98/08871, WO98/08872, e WO99/43708. Essas descobertas descrevem peptídeos lipofilicamente modificados e permitem a preparação deles.

Como aqui usado, o termo "porção anfifílica" refere-se a qualquer porção que tenha características lipofílicas e 30 hidrofílicas e sejam solúveis tanto em água quanto em

solventes lipofílicos. As moléculas anfifílicas usadas na presente invenção são compostas de porções lipofílicas e hidrofílicas. As porções lipofílicas são preferivelmente ácidos graxos naturais ou cadeias de alquil e aquelas acima 5 descritas. As porções hidrofílicas são selecionadas de polietileno glicol, polivinilpirrolidona, açúcar, e outros. As porções hidrofílicas são preferivelmente polietileno glicol (PEG) tendo menos que 1.000 unidades de etileno glicol. O tamanho e composição das porções lipofílicas e 10 das porções hidrofílicas podem ser ajustados para obter propriedades anfifílicas desejadas.

Como aqui usado, os termos "conjugados", "anexado", "ligado", e outros, com referência ao peptídeo e outros componentes do peptídeo modificado da presente invenção, 15 significam que as porções especificadas são ligadas uma a outra, preferivelmente covalentemente, através de um ligante, poente, espaçador ou outro.

Como aqui usado, os termos "ligante", "ponte", "espaçador", ou outro referem-se a um átomo ou um grupo de 20 átomos que ligam, preferivelmente covalentemente, por exemplo, uma porção lipofílica a um peptídeo terapêutico.

Para realizar a conjugação covalente, um peptídeo terapêutico pode ter um ou mais grupos funcionais adequados, ou pode ser modificado para incluir um ou mais 25 grupos funcionais adequados para ligação covalente a uma porção lipofílica ou anfifílica. Grupos funcionais adequados incluem, por exemplo, os seguintes grupos: grupo hidroxil, grupo amino (grupo amino primário ou amino secundário), grupo tiol, e grupo carboxil. As porções 30 lipofílicas ou anfifílicas da presente invenção podem ter

um ou mais grupos funcionais adequados, ou podem ser modificadas para incluir um ou mais grupos funcionais adequados para ligação covalente a um peptídeo. Grupos funcionais adequados incluem, por exemplo, os seguintes 5 grupos: grupo hidroxil, grupo amino (grupo amino primário ou amino secundário), grupo tiol, grupo carboxil, grupo aldeído, grupo isocianato, grupo de ácido sulfônico, grupo de ácido sulfúrico, grupo de ácido fosfórico, grupo de ácido fosfônico, grupo de haleto alílico, grupo de haleto 10 benzílico, grupo de haleto benzílico substituído, e grupo oxiranil.

Um peptídeo terapêutico pode ser diretamente ou indiretamente ligado com uma ou mais porções lipofílicas através de um grupo éster, grupo amida, grupo amina 15 secundária ou terciária, grupo carbamato, grupo sulfonato, grupo sulfato, grupo fosfato, grupo fosfonato, ou grupo éter.

Em uma modalidade da presente invenção, ácido palmítico foi ativado com N-hidroxisuccinimida e então 20 reage com grupos amina em octreotida, um octapeptídeo, para formar um conjugado através de um ligante de amida entre a porção lipofílica de palmitil e o peptídeo. Há dois grupos de amina primária em octreotida. Ambos grupos amina podem ser conjugados simultaneamente ou apenas um grupo amina 25 pode ser seletivamente conjugado por ajuste das condições de reação seguida por separação.

Em uma outra modalidade, decanal, um composto lipofílico com um grupo final aldeído, reagiu com os grupos amina em octreotida para formar um conjugado através de uma 30 ligação de amina secundária. Ambos grupos amina podem ser

conjugados simultaneamente ou apenas um grupo amina pode ser conjugado por ajuste das condições de reação seguido por separação.

Em uma modalidade adicional, ácido palmítico foi conjugado a lisozima através de seus seis grupos amina em várias proporções. Quando a proporção de ácido palmítico para lisozima é menor que 6, os sítios de conjugação na lisozima podem ser aleatoriamente dependentes da reatividade de cada grupo amina.

Ainda em uma outra modalidade, grelina é um peptídeo acilado através de seu grupo hidroxil com uma porção n-octanoil. Grelina é um peptídeo gástrico que estimula o a secreção do hormônio de crescimento e aumenta a adiposidade. Ela é o primeiro ligante natural identificado para um receptor secretagogo do hormônio do crescimento previamente clonado que está presente na glândula pituitária e na região hipotalâmica do cérebro.

A porção lipofílica pode ser primeiro covalentemente ligada a uma porção hidrofílica para formar uma molécula anfifílica. As moléculas anfifílicas da presente invenção podem ter um ou mais grupos funcionais adequados, ou podem ser modificadas para ter um ou mais grupos funcionais adequados para ligação covalente a um peptídeo. Grupos funcionais adequados são selecionados de grupo hidroxil, grupo amino (grupo amino primário ou grupo amino secundário), grupo tiol, grupo carboxil, grupo aldeído, grupo isocianato, grupo de ácido sulfônico, grupo de ácido sulfúrico, grupo de ácido fosfórico, grupo de ácido fosfônico, grupo de haleto alílico, grupo de haleto benzílico, grupo de haleto benzílico substituído, e grupo

oxiranil.

Um peptídeo terapêutico pode ser diretamente ou indiretamente ligado com uma ou mais porções anfifílicas através de um grupo éster, grupo amida, grupo amina 5 secundária ou terciária, grupo carbamato, grupo sulfonato, grupo sulfato, grupo fosfato, grupo fosfonato, ou grupo éter.

Preferivelmente, um peptídeo terapêutico é covalentemente conjugado a uma ou mais moléculas 10 anfifílicas que compreendem (a) uma porção hidrofílica e (b) uma porção lipofílica, em que as características hidrofílicas e lipofílicas equilibradas da molécula anfifílica transmite ao conjugado solubilidade adequada em fluido biológico ou solução aquosa.

15 Mais preferivelmente, um peptídeo terapêutico é covalentemente conjugado a uma ou mais moléculas anfifílicas que compreendem (a) uma porção linear de polietileno glicol e (b) uma porção lipofílica, em que o peptídeo terapêutico, o polietileno glicol e a porção 20 lipofílica são arrumados de forma conformacional para terem a porção lipofílica disponível exteriormente para interação com o ambiente lipofílico ou membranas celulares. Tal peptídeo anfifilicamente modificado tem uma resistência química aumentada à reação com o polímero biodegradável 25 tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em relação ao peptídeo não conjugado.

Preferivelmente, a molécula anfifílica tem a seguinte estrutura geral: L-S-(OC₂H₄)_mOH (Fórmula 1), em que L é a porção lipofílica preferivelmente selecionada de C₃₋₃₉- 30 alquil, C₃₋₃₉-alquenil, C₃₋₃₉-alcadienil, tocoferol e

resíduos esteróides, e em que S é um ligante selecionado de de um grupo éster, grupo amida, grupo amina secundária ou terciária, grupo carbamato, grupo sulfonato, grupo sulfato, grupo fosfato, grupo fosfonato, ou grupo éter.

5 Em uma modalidade, um grupo alquil de 16 carbonos foi covalentemente ligado a uma molécula de polietileno glicol através de uma ligação de éter. A molécula anfifílica resultante tem um grupo hidroxil que pode ser ativado ou derivatizado para reagir com grupos funcionais adequados em 10 peptídeos. Em uma modalidade da presente invenção a molécula anfifílica foi derivatizada para ter um grupo final aldeído. Então a molécula anfifílica foi covalentemente conjugada a octreotida através da reação com grupos amina em octreotida seguida por reação de redução 15 com NaCNBH₃. Ambos os grupos amina em octreotida podem ser conjugados simultaneamente ou apenas um grupo amina pode ser seletivamente conjugado por ajuste das condições de reação seguida por separação. O conjugado foi formado através de uma amina secundária que não muda as 20 características de carga da octreotida não conjugada. Essa propriedade pode ser útil para reter a atividade do peptídeo.

Em uma outra modalidade, a molécula anfifílica monopalmitil poli(etileno glicol) (P.m. ~1.124) foi ativada 25 com 4-nitrofenil cloroformato. Então a molécula anfifílica foi covalentemente conjugada a octreotida através da reação com grupos amina em octreotida. Ambos os grupos amina em octreotida podem ser conjugados simultaneamente ou apenas um grupo amina pode ser seletivamente conjugado por ajuste 30 das condições de reação seguida por separação.

Peptídeos covalentemente modificados com uma ou mais porções lipofílicas ou anfifílicas incluem, por exemplo, sais e complexos farmaceuticamente aceitáveis do peptídeo modificado. A modificação pode ser em um ou mais sítios no 5 peptídeo. Tais peptídeos também incluem, por exemplo, peptídeos modificados especificamente em sítio e misturas de peptídeos modificados de mono-sítio e múltiplos sítios.

Um "sal farmaceuticamente aceitável" significa um sal formado entre qualquer um ou mais dos grupos carregados em 10 um peptídeo e qualquer um ou mais cátions ou ânions não tóxicos, farmaceuticamente aceitáveis. Sais orgânicos e inorgânicos incluem, por exemplo, aqueles preparados a partir de ácidos como clorídrico, sulfúrico, sulfônico, tartárico, fumárico, hidrobrômico, glicólico, cítrico, 15 maleico, fosfórico, succínico, acético, nítrico, benzólico, ascórbico, *p*-toluenossulfônico, benzenossulfônico, naftalenossulfônico, propiônico, carbônico, e outros, ou, por exemplo, amônio, sódio, potássio, cálcio ou magnésio.

O termo "polímero insolúvel em água biodegradável" 20 inclui qualquer polímero sintético ou natural biocompatível (ou seja, farmaceuticamente aceitável) e biodegradável possa ser usado *in vivo*. Esse termo também inclui polímeros que só insolúveis ou tornam-se insolúveis em água ou fluido biológico a 37°C. Os polímeros podem ser purificados, 25 opcionalmente, para remover monômeros e oligômeros com o uso de técnicas conhecidas na técnica (por exemplo, Patente U.S. No. 4.728.721; Pedido de Patente U.S. No. 2004/0228833). Alguns exemplos não limitantes de tais polímeros são polilactídeos, poliglicolídeos, 30 policaprolactonas, polidioxanonas, policarbonatos,

polihidroxibutiratos, polialquíleno oxalatos, polianidridos, poliamidas, poliésteramidas, poliuretanos, poliacetais, poliortocarbonatos, polifosfazenos, polihidroxivaleratos, polialquíleno succinatos e 5 poliortoésteres, e copolímeros, copolímeros em bloco, copolímeros ramificados, terpolímeros e combinações e misturas desses.

Pesos moleculares adequados para polímeros podem ser determinados por uma pessoa de habilidade comum na técnica.

10 Fatores que podem ser considerados quando da determinação de pesos moleculares incluem a taxa desejada de degradação do polímero, resistência mecânica, e taxa de dissolução do polímero em solvente. Tipicamente, uma faixa adequada de pesos moleculares de polímeros é de cerca de 2.000 Daltons 15 a cerca de 150.000 Daltons com uma polidispersibilidade de 1,1 a 2,8, dependendo de qual polímero é selecionado para uso, entre outros fatores.

De acordo com a invenção, as formulações farmacêuticas de peptídeos terapêuticos são preparadas na forma de 20 soluções ou suspensões injetáveis de um polímero em um solvente farmaceuticamente aceitável que contém peptídeos modificados lipofilicamente ou anfifilicamente dispersos ou solubilizados. Por ligação covalente de um peptídeo com uma molécula lipofílica ou anfifílica, alguns grupos reativos 25 em peptídeo são protegidos e não disponíveis para interagir com polímero em solução. Portanto, a estabilidade do peptídeo e do polímero nas composições da presente invenção é melhorada por modificação covalente do peptídeo.

Portanto, a presente invenção fornece um método de 30 formação de um implante sólido, biodegradável *in-situ*, em

um indivíduo, que compreende: (a) dissolução ou dispersão de um polímero biodegradável biocompatível, insolúvel em água, e um peptídeo terapêutico covalentemente modificado com uma ou mais porções lipofílicas ou anfifílicas em um solvente orgânico biocompatível, hidrossolúvel para formar a composição; o solvente orgânico sendo capaz de se dissipar ou difundir em um fluido corporal após colocação em um tecido do corpo; and (b) administração da composição em um local de implante no corpo, de modo a permitir que o solvente orgânico se dissipe ou difunda nos fluidos corporais, e que o polímero coagule ou solidifique para produzir o implante sólido biodegradável.

Adicionalmente, a presente invenção fornece uma composição líquida farmacêutica para formação de um implante biodegradável *in-situ* em um corpo, que compreende uma quantidade eficaz de um polímero biodegradável biocompatível, insolúvel em água e uma quantidade eficaz de um peptídeo terapêutico covalentemente modificado com uma ou mais porções lipofílicas ou anfifílicas, que são dissolvidos ou dispersos em uma quantidade eficaz de um solvente orgânico biocompatível, hidrossolúvel; em que o solvente é capaz de se dissipar ou difundir em um fluido corporal e o polímero é capaz de coagular ou solidificar após contato com o fluido corporal.

Peptídeos e moléculas lipofílicas ou anfifílicas adequados são aqueles acima definidos. A proporção molar de peptídeo para molécula lipofílica ou anfifílica no conjugado irá variar, por exemplo, de 1:1 a 1:10 de acordo com a natureza do peptídeo.

Qualquer polímero biodegradável adequado pode ser

empregado, desde que o polímero seja insolúvel ou torne-se insolúvel em meio aquoso ou fluido corporal a 37°C. polímeros biodegradáveis adequados são aqueles acima definidos.

5 O tipo, peso molecular, e quantidade de polímero biodegradável presente nas composições podem influenciar a duração de tempo em que o peptídeo é liberado do implante de liberação controlada. A seleção do tipo, peso molecular, e quantidade de polímero biodegradável presente nas 10 composições para atingir as propriedades desejadas do implante de liberação controlada pode ser realizada por uma pessoa de habilidade comum na técnica através de experimentação rotineira.

Solventes orgânicos farmaceuticamente aceitáveis 15 incluem, sem limitação, N-metil-2-pirrolidona, N,N-dimetilformamida, dimetil sulfóxido, propileno carbonato, caprolactama, triacetina, benzoato de benzila, álcool benzílico, lactato de etila, gliceril triacetato, ésteres de ácido cítrico, polietileno glicóis, alcoxipolietileno 20 glicóis e acetatos de polietileno glicol, ou qualquer combinação desses.

Os critérios para os solventes orgânicos de polímeros biodegradáveis são que eles sejam farmaceuticamente aceitáveis e miscíveis e dispersíveis em meio aquoso ou 25 fluido corporal. O solvente orgânico adequado deve ser capaz de se difundir em fluido corporal de modo que a composição líquida coagule ou solidifique para formar um implante *in situ*. Solventes únicos e/ou misturados podem ser empregados, e a adequação de tais solventes pode ser 30 determinada facilmente por experimentação rotineira.

As composições farmacêuticas da invenção tipicamente contêm peptídeos em uma faixa de 0,1 a 40% p/v. Em geral, a carga ótima de fármaco é dependente do período de liberação desejado e da potencia do peptídeo. Obviamente, para um 5 peptídeo de baixa potencia e um maior período de liberação, maiores níveis de incorporação podem ser necessários.

A viscosidade das composições líquidas injetáveis da invenção é determinada pelo peso molecular do polímero e solvente orgânico usados. Por exemplo, quando poli(lactide-co-glicolídeo) é usado, a solução de poliéster em NMP tem 10 uma menor viscosidade que em mPEG350. Tipicamente, quando o mesmo solvente é usado, quanto maior o peso molecular e concentração do polímero, maior a viscosidade. Preferivelmente a concentração do polímero em solução está 15 abaixo de 70% em peso. Mais preferivelmente, a concentração do polímero em solução é entre 20 to 60% em peso.

A liberação de peptídeos lipofilicamente ou anfifilicamente modificados desses implantes de formação *in-situ* seguirá as regras gerais para a liberação de um 20 fármaco a partir de um dispositivo polimérico monolítico. A liberação de peptídeos lipofilicamente ou anfifilicamente modificados pode ser afetada pelo tamanho e formato do implante, pela carga de peptídeos lipofilicamente ou anfifilicamente modificados no implante, pelos fatores de 25 permeabilidade que envolvem os peptídeos lipofilicamente ou anfifilicamente modificados e o polímero em particular, e a degradação do polímero. Dependendo da quantidade dos peptídeos modificados selecionados para liberação, os parâmetros acima podem ser ajustados por uma pessoa 30 habilitada na técnica de liberação de fármacos para gerar a

taxa e duração de liberação desejadas.

A quantidade de composição injetável administrada dependerá tipicamente das propriedades desejadas do implante de liberação controlada. Por exemplo, a quantidade 5 de composição de solução injetável pode influenciar a duração de tempo em que o peptídeo é liberado do implante de liberação controlada.

De acordo com a presente invenção, as composições que contêm os peptídeos lipofilicamente ou anfifilicamente 10 modificados podem ser administradas a um indivíduo em que a liberação sustentada controlada de um peptídeo é desejada. Como aqui usado, o termo "indivíduo" deve incluir animais de sangue quente, preferivelmente, mamíferos, mais preferivelmente humanos.

15 Como aqui usado, o termo "administrada" refere-se a distribuição, liberação ou aplicação de uma composição (por exemplo, formulação farmacêutica) a um indivíduo por qualquer via adequada para liberação da composição ao local desejado no indivíduo, incluindo liberação por injeção e/ou 20 implante subcutâneo, intramuscular, intraperitoneal, ou intradérmico, e por administração membranas mucosas para fornecer a dosagem desejada de um peptídeo com base nos parâmetros conhecidos para o tratamento das várias condições médicas com os peptídeos terapêuticos.

25 O termo "liberação sustentada, controlada", como aqui usado, inclui, por exemplo, a liberação contínua de um peptídeo terapêutico *in vivo* por um período de tempo após a administração, preferivelmente de pelo menos vários dias a semanas ou meses. Liberação sustentada, controlada do 30 peptídeo pode ser demonstrada, por exemplo, pelo efeito

terapêutico continuado do agente pelo tempo (por exemplo, para octreotida, liberação sustentada do peptídeo pode ser demonstrada por produção continuada de GH pelo tempo). Alternativamente, a liberação sustentada do agente pode ser 5 demonstrada por detecção da presença do agente *in vivo* pelo tempo.

Nesse pedido, as várias modalidades apresentadas nas reivindicações para as atuais composições líquidas farmacêuticas são também contempladas, *mutatis mutandis*, 10 para os atuais métodos para formação de tais composições e os métodos para a formação de implantes sólidos.

EXEMPLOS:

Os exemplos a seguir ilustram as composições e métodos da presente invenção. Os exemplos a seguir não devem ser 15 considerados como limitações, mas devem apenas ensinar como fazer os sistemas de liberação de fármacos úteis.

Exemplo 1. Preparação de Palmitoil-Octreotida (PAL-OCT)

50 mg de acetato de octreotida foram dissolvidos em 1 mL de DMSO anidro contendo 100 µL trietilamina (TEA). 40,2 20 mg de éster N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico (P.m. 353,50) foram dissolvidos em 3 mL DMSO anidro e adicionados à solução do peptídeo. A reação foi deixada para prosseguir por 3 horas em temperatura ambiente. A mistura foi despejada em éter dietílico para precipitar octreotida 25 palmitoilada. O precipitado foi lavado com éter dietílico duas vezes e então seco sob vácuo. O peptídeo acilado resultante estava na forma de um pó branco.

Exemplo 2. Preparação de Palmitoil-Octreotida (PAL-OCT)

50 mg de acetato de octreotida foram dissolvidos em 30 1000 µL de DMSO anidro contendo 100 µL TEA. 17,1 mg de

éster N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico (p.m. 353,50) foram dissolvidos em 3 mL DMSO anidro e adicionados por injeção direta à solução do peptídeo. A reação foi deixada para prosseguir de um dia para o outro em temperatura ambiente. A mistura foi despejada em éter dietílico para precipitar octreotida palmitoilada. O precipitado foi lavado com éter dietílico duas veze e então seco sob vácuo. O peptídeo acilado resultante estava na forma de um pó branco.

10 **Exemplo 3. Preparação de Decanal-Octreotida (DCL-OCT)**

50 mg de octreotida foram dissolvidos em 2 mL de solução de 20 mM cianoborohidreto de sódio (P.m. 62,84, NaCNBH₃) (2,51 mg) em 0,1 M de tampão de acetato em pH 5. 13,7 mg de Decanal (P.m. 156,27) (OCT:DCL = 1:2) foram adicionados por injeção direta à solução do peptídeo. A reação foi deixada para prosseguir de um dia para o outro a 4°C. A mistura foi separada por centrifugação. A PAL-OCT precipitada foi liofilizada.

20 **Exemplo 4. Preparação de Palmitoil-Lisozima (PAL-Lyz, 3:1)**

302 mg de Lisozima (P.m. 14.500) foram dissolvidos em 1.000 µL de DMSO anidro contendo 200 µL TEA. 18,25 mg de éster N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico (P.m. 353,50) foram dissolvidos em 3 mL DMSO anidro e adicionados por injeção direta à solução da proteína. A reação foi deixada para prosseguir de um dia para o outro em temperatura ambiente. A PAL-Lyz foi precipitada em éter dietílico e o produto final foi liofilizado após remoção do solvente orgânico.

30 **Exemplo 5. Liberação de Palmitoil-Lisozima a partir de**

formulações de polímero injetável

40% PLGA RG503H foi preparado por dissolução adequada do polímero em mPEG350. então palmitoil-Lisozima e lisozima foram misturadas com a solução do polímero em cerca de 7% 5 respectivamente. As formulações foram completamente misturadas para obter formulações uniformes.

Liberação *in vitro* de lisozima e lisozima palmitoilada a partir da solução injetável de polímero: as suspensões da formulação (cerca de 100 mg) foram injetadas em 3 mL de 10 solução salina tamponada por fosfato em pH 7,4 com 0,1% azida de sódio a 37°C. O fluido receptor foi substituído em pontos de tempo selecionados com solução de tampão fresco, e a solução de tampão removida foi diluída adequadamente com PB em pH 7,4 e analisada para concentração de fármaco 15 por espectrofotômetro de UV a 280 nm contra curvas padrão.

A Figura 1 mostra os perfis de liberação cumulativa de lisozima acilada e nativa. A lisozima nativa mostrou liberação significante inicialmente em comparação à lisozima acilada.

20 **Exemplo 6. Preparação de Palmitoil-Lisozima (PAL-Lyz, 5:1)**

50 mg de lisozima (P.m. 14.500) foram dissolvidos em água e o pH foi ajustado a 9,58. A solução foi liofilizada. Então o pó seco foi dissolvido em 3 mL DMSO. Então 322 μ L 25 de solução a 20 mg/mL de éster N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico (P.m. 353,50) em DMSO anidro foram adicionados por injeção direta à solução da proteína. A reação foi deixada para prosseguir de um dia para o outro a 4°C. A PAL-Lyz foi precipitada em éter dietílico e o 30 produto final foi liofilizado após remoção do solvente

orgânico.

Exemplo 7. Preparação de Palmitoil-Lisozima (PAL-Lyz, 13:1)

5 50 mg de lisozima (P.m. 14.500) foram dissolvidos em água e o pH foi ajustado a 9,58. A solução foi liofilizada. Então o pó seco foi dissolvido em 3 mL DMSO. Então 799 µL de solução de 20 mg/mL de éster N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico (P.m. 353,50) em DMSO anidro foram adicionados por injeção direta à solução da proteína. A 10 reação foi deixada para prosseguir de um dia para o outro a 4°C. A PAL-Lyz foi precipitada em éter dietílico e o produto final foi liofilizado após remoção do solvente orgânico.

Exemplo 8. Preparação de Palmitoil-Lisozima (PAL-Lyz)

15 Lisozima é adicionada a PAL-NHS em PBS (pH 8,0) contendo 2% desoxicolato (DOC). A mistura é incubada a 37°C por 6 horas. A mistura é centrifugada para remover a PAL-NHS que não reagiu. O produto é dialisado contra PBS contendo 0,15% DOC por 48 h. (PAL-NHS:Lyso=15:1).

20 Exemplo 9. Liberação de grelina a partir de formulações de polímero injetáveis

40% PLGA RG503H foi preparado por dissolução adequada do polímero em mPEG350. Então grelina (Humana, Rato 1-5) e grelina desacilada (Des-n-Octanoil-[Ser]³-grelina (Humana, Rato 1-5)) foram misturadas com a solução do polímero a cerca de 6% respectivamente. As formulações foram completamente misturadas para obter formulações uniformes.

As suspensões da formulação (cerca de 100 mg) foram injetadas em 3 mL de tampão de solução salina tamponada por 30 fosfato em pH 7,4 com 0,1% azida de sódio a 37°C. O fluido

receptor foi substituído em pontos de tempo selecionados com solução de tampão fresco, e a solução de tampão removida foi diluída adequadamente com PB em pH 7,4 e analisada para concentração de fármaco por HPLC usando 5 curvas padrão correspondentes. A Figura 2 mostra a liberação cumulativa de grelina e grelina desacilada em PBS. A grelina desacilada mostrou liberação muito mais rápida no período de duas semanas testado. A grelina com uma porção lipofílica mostrou uma taxa de liberação muito 10 mais lenta.

Exemplo 10. Preparação de Monopalmitil Poli(etileno glicol)-Butiraldeído, Dietil Acetal.

Uma mistura de monopalmitil poli(etileno glicol) (P.m. médio ~1.124) (5,0 g, 4,45 mmoles) e tolueno (75 mL) foi 15 azeotropicamente seca por destilação de tolueno sob pressão reduzida. O monopalmitil poli(etileno glicol) seco, foi dissolvido em tolueno anidro (50 mL) ao qual foi adicionada uma solução a 20% (p/p) de terc-butóxido de potássio em THF (4,0 ml, 6,6 mmoles) e 4-clorobutiraldeído dietil acetal 20 (0,96 g, 5,3 mmoles, P.m. 180,67). A mistura foi agitada a 100-105°C de um dia para o outro sob uma atmosfera de argônio. Após resfriamento até a temperatura ambiente, a mistura foi filtrada e adicionada a 150 ml de éter etílico a 0-5°C. O produto precipitado foi filtrado e seco sob 25 pressão reduzida.

Exemplo 11. A Conjugação de Octreotida em Grupo amina N-terminal com Monopalmitil Poli(etileno glicol) (PAL-PEG-BA-OCT)

Em uma preparação típica, 201,6 mg de monopalmitil 30 poli(etileno glicol)-butiraldeído, dietil acetal (PAL-PEG-

BADA) foram dissolvidos em 10 mL de 0,1 M ácido fosfórico (pH 2,1) e a solução resultante foi aquecida a 50°C por 1 h então resfriada até a temperatura ambiente. O pH da solução foi ajustado a 5,5 com 1 N NaOH e a solução resultante foi 5 adicionada a uma solução de 195,3 mg de octreotida em 3,5 mL de 0,1 M tampão de fosfato de sódio (pH 5,5). Depois de 1 hora, 18,9 mg de NaCNBH₃ foram adicionados para ter uma concentração de 20 mM. A reação foi continuada de um dia para o outro em temperatura ambiente. Então a mistura de 10 reação foi dialisada com um membrana que tem um valor de corte de P.m. de 2.000 daltons ou carregada em uma HPLC preparatória com uma coluna C-18. A octreotida purificado conjugada foi primariamente um composto único com uma amina primária (lisina), e uma amina secundária (N-terminal).

15 **Exemplo 12. Liberação in vitro e estabilidade de peptídeos e polímero biodegradável em composições líquidas poliméricas**

Poli(DL-lactide-co-glicolídeo) (PLGA) de uma proporção 85/15 de lactide para glicolídeo tendo uma 20 polidispersibilidade de 1,5 (DLPLG85/15, IV: 0,28) foi dissolvido em N-metil-2-pirrolidona (NMP) para obter uma solução a 50% em peso. O peptídeo foi misturado com uma solução de PLGA em NMP para gerar uma composição uniforme injetável em proporções mostradas na Tabela 1.

25 **Tabela 1: formulações poliméricas injetáveis testadas**

Amostras	Peptídeo (mg)	DLPLG 8515/NMP (mg)	Carga do fármaco (%, p/p)
vazio	0	1.000	0
OCT	60	940	6

Pal-PEG-BA-OCT	120	880	6
----------------	-----	-----	---

Uma alíquota de cada formulação foi retirada para liberação *in vitro* em tampão de fosfato em pH 7,4 contendo 0,1% azida de sódio a 37°C e a formulação restante foi usada para monitorar a estabilidade dos peptídeos e o polímero em temperatura ambiente pelo tempo. Os pontos de tempo são 0,125, 1, 2, 5, 7, 14, 21, e 28 dias. A pureza dos peptídeos na amostra foi determinada por HPLC. O peso molecular do polímero foi determinado por cromatografia de permeação em gel (GPC) usando padrões de poliestireno com pesos moleculares conhecidos.

De acordo com técnica prévia, a presença de um grupo nucleofílico em um peptídeo pode levar a uma interação entre o peptídeo e o polímero biodegradável da composição. Os grupos nucleofílicos no peptídeo podem reagir com o polímero biodegradável para formar produtos acilados e podem catalisar a degradação do polímero biodegradável. É bem conhecido que quando a octreotida e poli(DL-lactide-co-glicolídeo) são combinados, especialmente em uma solução orgânica como NMP, a octreotida será cilada e o polímero será degradado rapidamente. A conjugação N-terminal da octreotida na presente invenção contém uma amina primária, uma amina secundária e um grupo de ácido carboxílico C-terminal e espera-se que interaja e/ou reaja com o polímero de modo similar à octreotida. No entanto, foi inesperadamente constatado que a octreotida covalentemente conjugada da presente invenção evitou a reação de acilação e reduziu significativamente a taxa de degradação do polímero em relação à octreotida não modificada. Como descrito na técnica prévia e mostrado na Tabela 2, quando a

octreotida foi misturada com solução de poli(DL-lactide-co-glicolídeo) em NMP, a octreotida foi acilada mais de 80% em 24 horas em temperatura ambiente e reagiu quase completamente depois de 7 dias. No entanto, a octreotida 5 covalentemente conjugada foi estável mesmo depois de 56 dias sob a mesma condição. Como mostrado na Tabela 3, o peso molecular do polímero na formulação que contém octreotida diminuiu rapidamente em temperatura ambiente. Depois de 21 dias, o peso molecular do polímero foi 10 reduzido em 50%. No entanto, para o polímero na formulação que contém octreotida covalentemente conjugada, mais de 90% do peso molecular original foi retido.

Tabela 2: Estabilidade dos peptídeos em formulações líquidas poliméricas

tempo		
(dias)	Octreotida	PAL-PEG-BA-OCT
7	2,3	99,6
14	0,6	100,0
21	0,3	100,0
56	0,0	100,0

15 **Tabela 3: Estabilidade do polímero em formulações líquidas poliméricas**

Tempo			
(dias)	8515PLG em NMP	Octreotida	PAL-PEG-BA-OCT
0	100	100	100
0,1	100,0	95,8	100,6
1	99,2	75,3	99,8
2	99,0	66,1	98,8
3	102,0	65,3	100,4
7	98,9	59,0	98,6

<u>14</u>	<u>100,8</u>	<u>57,1</u>	<u>98,1</u>
<u>21</u>	<u>98,2</u>	<u>51,3</u>	<u>92,2</u>

Como revelado na técnica prévia, para manter a estabilidade de agentes bioativos e excipientes na formulação, geralmente, o agente bioativo é embalado separadamente de outros componentes da formulação, como na formulação comercial de leuprolida Eligard. Então todos os ingredientes são misturados imediatamente antes do uso. Embora, tal preparação possa evitar a interação entre peptídeos e polímeros biodegradáveis durante a estocagem, ela não evita qualquer interação após serem misturados. A interação entre os peptídeos e o polímero pode ocorrer durante a administração e subsequente liberação *in vitro* ou *in vivo*.

Quando uma alíquota de cada formulação após preparação foi retirada para conduzir liberação *in vitro* em tampão de fosfate em pH 7,4 contendo 0,1% azida de sódio a 37°C, foi constatado surpreendentemente que a interação entre octreotida e o polímero ocorreu durante a mistura e a subsequente liberação *in vitro*. Como mostrado na Figura 3, cerca de 30% da octreotida detectada no meio de liberação foi degradada ou reagiu com o polímero em 3 horas. E mais de 50% da octreotida detectada no meio de liberação foi degradada ou acilada após 28 dias. Depois de 28 dias, a matriz do polímero foi dissolvida em acetonitrila, e o polímero foi precipitado com o uso de água. A octreotida foi analisada por HPLC. Descobriu-se que mais de 50% da octreotida que permanece na matriz do polímero foi também acilada. Tal degradação e/ou acilação da octreotida deve reduzir significativamente a disponibilidade da octreotida

nativa e pode produzir subprodutos tóxicos indesejados. Seria altamente vantajoso evitar tal interação entre o peptídeo e o polímero.

A Figura 4 mostra a liberação *in vitro* da octreotida covalentemente conjugada Pal-PEG-BA-OCT. Embora a octreotida modificada contenha nucleófilos similares como a octreotida não modificada, foi constatado de modo surpreendente que nenhuma degradação da octreotida modificada foi detectada no meio de liberação e na matriz do polímero por 28 dias. Os resultados indicam que a conjugação covalente do peptídeo com uma porção anfifílica como monopalmitil poli(etileno glicol) por prevenir ou reduzir significativamente a interação e/ou reação entre peptídeos e polímeros biodegradáveis.

15 Exemplo 13. Preparação de monopalmitil poli(etileno glicol) ativado com 4-nitrofenil cloroformato (NPC)

Uma mistura de monopalmitil poli(etileno glicol) (P.m. médio ~1.124) (10,0 g, 8,9 mmoles) e benzeno (100 mL) foi azeotropicamente seca por destilação de 50 mL benzeno sob pressão reduzida. A mistura de reação foi resfriada a 30°C, seguida pela adição de piridina anidra (0,809 mL, 10 mmol) sob argônio e 4-nitrofenil cloroformato (2,015 g, 10,0 mmoles). Uma vez que a adição estivesse completa, a reação foi agitada a 45°C por 2 h seguida por agitação de um dia para o outro em temperatura ambiente.

A mistura de reação foi então filtrada, seguida por remoção do solvente do filtrado por destilação *in vacuo*. O resíduo foi recristalizado de 2-propanol para gerar 8,2 g do produto (PAL-PEG-NPC).

30 Exemplo 14. Conjugação de Octreotida com Monopalmitil

Poli(etileno glicol) (PAL-PEG-OCT)

236,5 mg de PAL-PEG-NPC foram adicionados a uma solução de 239 mg de octreotida em 10 mL de 50 mM tampão de borato de sódio (pH 9). A solução foi magneticamente agitada continuamente de um dia para o outro. A solução final foi dialisada com o uso de uma membrana de valor de corte de P.m. de 2.000. A solução dialisada foi liofilizada e analisada por HPLC. Os resultados indicam que o peptídeo modificado é uma mistura de octreotida conjugada de sítio único e de múltiplos sítios.

A invenção não é limitada pelas modalidades acima descritas que são apresentadas apenas como exemplos e podem ser modificadas de várias formas dentro do escopo de proteção definido pelas reivindicações em apêndice.

Reivindicações

1. Composição polimérica líquida farmacêutica para liberação controlada de um polipeptídeo terapêutico, caracterizada por compreender: (a) um polímero biodegradável, insolúvel em água, farmaceuticamente aceitável; (b) um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável que solubiliza o polímero biodegradável; e (c) um polipeptídeo terapêutico conjugado com uma ou mais porções lipofílicas, em que a composição está na forma de um líquido viscoso injetável e é capaz de formar um implante de liberação controlada por dissipação ou dispersão do solvente orgânico no corpo de um indivíduo e em que a composição tem uma maior estabilidade *in vitro* e uma menor liberação em explosão inicial do que a composição teria se o polipeptídeo terapêutico não fosse conjugado às porções lipofílicas.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo e a porção lipofílica ou porções são covalentemente conjugados.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo e a porção lipofílica ou porções são covalentemente conjugados através de um espaçador, uma ponte ou um grupo ligante.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em ocitocina, vasopressina, hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), prolactina, hormônios como hormônio luteinizante, hormônio de liberação de hormônio

luteinizante (LHRH), agonistas de LHRH, antagonistas de LHRH, hormônios do crescimento, fator de liberação do hormônio do crescimento, insulina, eritropoietina, somatostatina, glucagon, interleucina, interferon-alfa, 5 interferon-beta, interferon-gama, gastrina, tetragastrina, pentagastrina, urogastrona, secretina, calcitonina, encefalinas, endorfinas, angiotensinas, hormônio de liberação de tireorotrofinas (TRH), fator de necrose tumoral (TNF), hormônio da paratireóide (PTH), fator de 10 crescimento de nervo (NGF), fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônia de granulócitos macrófagos (GM-CSF), fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), heparinase, fator de crescimento endotelial vascular (VEG-F), proteína 15 morfogênica óssea (BMP), hANP, peptídeo semelhante a glucagon (GLP-1), exenatida, peptídeo YY (PYY), grelina, renina, bradiquinina, bacitracinas, polimixinas, colistinas, tirocidina, gramicidinas, ciclosporinas, enzimas, citocinas, anticorpos, vacinas, antibióticos, 20 anticorpos, glicoproteínas, hormônio folículo-estimulante, quiotorfina, taftsinina, timopoietina, timosina, timoestimulina, fator humorai tímico, fator humorai tímico sérico, fatores estimulantes de colônia, motilina, bombesina, dinorfina, neuropeptídeo Y, ceruleina, uroquinase, 25 calikreina, análogos e antagonistas de substância P, angiotensina II, fatores de coagulação sanguínea VII e IX, lisozima, gramicidinas, hormônio estimulante de melanócitos, hormônio de liberação de hormônio da tireóide, hormônio estimulante da tireóide, pancreozimina, 30 colecistoquinina, lactogênio placentário humano,

gonadotrofina coriônica humana, peptídeo estimulante da síntese de proteína, peptídeo inibidor gástrico, peptídeo intestinal vasoativo, fator de crescimento derivado de plaquetas, hormônios pigmentares, somatomedina, 5 gonadotrofina coriônica, fatores de liberação hipotalâmicos, hormônios antidiuréticos, hormônio estimulante da tireóide, bifalina e prolactina.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado 10 do grupo que consiste em doxorrubicina, rapamicina, naltrexona, fator de crescimento epidérmico (EGF), um agonista de LHRH, um antagonista de LHRH, um hormônio do crescimento, fator de liberação de hormônio do crescimento, octreotida, interferon-alfa, interferon-beta, interferon-15 gama, calcitonina, hormônio da paratireóide (PTH), peptídeo semelhante a glucagon (GLP-1), e peptídeo YY (PYY).

7. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1).

20 8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é exendina.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é octreotida

10. Composição, de acordo com a reivindicação 1, 25 caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é insulina.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a porção lipofílica é selecionada do grupo que consiste em C₃₋₃₉-alquil, C₃₋₃₉-alquenil, C₃₋₃₉-alcadienil, tocoferol e compostos 30 esteróides.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que cada um de C₃₋₃₉-alquil, C₃₋₃₉-alquenil e C₃₋₃₉-alcadienil é (i) cadeia linear ou ramificada, e (ii) saturado, monoinsaturado ou di-insaturado.

5 13. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a porção lipofílica é um lipídeo.

10 14. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polímero biodegradável é selecionado do grupo consiste em um polilactídeo, poliglicolídeo, policaprolactona, polidioxanona, policarbonato, polihidroxibutirato, polialquíleno oxalato, polianidrido, poliamida, poliesteramida, poliuretano, 15 poliacetal, poliortocarbonato, polifosfazeno, polihidroxivalerato, polialquíleno succinato e poliortoéster, e copolímeros, copolímeros em bloco, copolímeros ramificados, terpolímeros e combinações e misturas desses.

20 15. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polímero biodegradável é selecionado do grupo que consiste em um ácido polilático e um ácido poliglicólico, e copolímeros desses.

25 16. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o solvente orgânico é selecionado do grupo que consiste em N-metil-2-pirrolidona, N,N-dimetilformamida, dimetil sulfóxido, propileno carbonato, caprolactama, triacetina, benzoato de benzila, álcool benzílico, lactato de etila, gliceril triacetato, um 30 éster de ácido cítrico, polietileno glicol,

alcoxipolietileno glicol, polietileno glicol acetato, ou qualquer combinação desses.

17. Método caracterizado pelo fato de ser para a formação da composição polimérica líquida farmacêutica da reivindicação 1, que compreende as etapas de: (a) dissolução de um polímero biodegradável insolúvel em água, farmaceuticamente aceitável, em um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável para formar uma solução de polímero; e (b) mistura da solução do polímero com uma quantidade eficaz de um polipeptídeo terapêutico conjugado com uma ou mais porções lipofílicas para formar a composição farmacêutica.

18. Método caracterizado pelo fato de ser para a formação de um implante sólido, biodegradável *in-situ* para liberação sustentada de um polipeptídeo terapêutico que compreende a administração da composição polimérica líquida farmacêutica da reivindicação 1 em um local de implante no corpo de um indivíduo.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é administrada por injeção.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a injeção é por via subcutânea ou intramuscular.

25 21. Método caracterizado por ser para a formação de um implante sólido, biodegradável *in-situ* para liberação sustentada de um polipeptídeo terapêutico que compreende (a) a formação de uma composição polimérica líquida farmacêutica de acordo com Método, de acordo com a reivindicação 17, e (b) administração da composição

resultante em um local de implante no corpo de um indivíduo.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é administrada por injeção.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a injeção é por via subcutânea ou intramuscular.

24. Composição polimérica líquida farmacêutica para liberação controlada de um polipeptídeo terapêutico, caracterizada por compreender: (a) um polímero biodegradável, insolúvel em água, farmaceuticamente aceitável; (b) um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável que solubiliza o polímero biodegradável; e (c) um polipeptídeo terapêutico conjugado com uma ou mais porções lipofílicas, em que a composição está na forma de um líquido viscoso injetável e é capaz de formar um implante de liberação controlada por dissipação ou dispersão do solvente orgânico no corpo de um indivíduo e em que a composição tem uma maior estabilidade *in vitro* e uma menor liberação em explosão inicial do que a composição teria se o polipeptídeo terapêutico não fosse conjugado às porções anfifílicas.

25. Composição, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo e a porção anfifílica ou porções são covalentemente conjugados.

26. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo e a porção anfifílica ou porções são covalentemente conjugados através de espaçador, ponte ou um grupo ligante.

27. Composição, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em ocitocina, vasopressina, hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), prolactina, hormônios como hormônio luteinizante, hormônio de liberação de hormônio luteinizante (LHRH), agonistas de LHRH, antagonistas de LHRH, hormônios do crescimento, fator de liberação do hormônio do crescimento, insulina, eritropoietina, somatostatina, glucagon, interleucina, interferon-alfa, interferon-beta, interferon-gama, gastrina, tetragastrina, pentagastrina, urogastrona, secretina, calcitonina, encefalinas, endorfinas, angiotensinas, hormônio de liberação de tireorotrofinas (TRH), fator de necrose tumoral (TNF), hormônio da paratireóide (PTH), fator de crescimento de nervo (NGF), fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônia de granulócitos macrófagos (GM-CSF), fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), heparinase, fator de crescimento endotelial vascular (VEG-F), proteína morfogênica óssea (BMP), hANP, peptídeo semelhante a glucagon (GLP-1), exenatida, peptídeo YY (PYY), grelina, renina, bradiquinina, bacitracina, polimixina, colistina, tirocidina, gramicidina, ciclosporina, enzima, citocina, anticorpo, vacina, antibiótico, anticorpos, glicoproteínas, hormônio folículo-estimulante, quiotorfina, taftsinina, timopoietina, timosina, timoestimulina, fator humoral tímico, fator humoral tímico sérico, fatores estimulantes de colônia, motilina, bombesina, dinorfina, neurotensina,

ceruleina, uroquinase, calikreina, análogos e antagonistas de substância P, angiotensina II, fatores de coagulação sanguínea VII e IX, lisozima, gramicidina, hormônio estimulante de melanócitos, hormônio de liberação de 5 hormônio da tireoíde, hormônio estimulante da tireoíde, pancreozimina, colecistoquinina, lactogênio placentário humano, gonadotrofina coriônica humana, peptídeo estimulante da síntese de proteína, peptídeo inibidor gástrico, peptídeo intestinal vasoativo e fator de 10 crescimento derivado de plaquetas.

28. Composição, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em ACTH, glucagon, somatotrofina, timosina, um hormônio pigmentar, somatomedina, 15 gonadotrofina coriônica, um fator de liberação hipotalâmico, um hormônio antidiurético, hormônio estimulante da tireoíde, bifalina e prolactina.

29. Composição, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em doxorrubicina, rapamicina, 20 naltrexona, fator de crescimento epidérmico (EGF), um agonista de LHRH, um antagonista de LHRH, um hormônio do crescimento, fator de liberação de hormônio do crescimento, octreotida, interferon-alfa, interferon-beta, interferon-25 gama, calcitonina, hormônio da paratireoíde (PTH), peptídeo semelhante a glucagon (GLP-1), e peptídeo YY (PYY).

30. Composição, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1).

31. Composição, de acordo com a reivindicação 24,

caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é exendina.

32. Composição, de acordo com a reivindicação 24,
caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é octreotida.

33. Composição, de acordo com a reivindicação 24,
5 caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo is insulina.

34. Composição, de acordo com a reivindicação 24,
caracterizada pelo fato de que a porção lipofílica da
porção anfifílica é selecionada do grupo que consiste em
C₃₋₃₉-alquil, C₃₋₃₉-alquenil, C₃₋₃₉-alcadienil, tocoferol e
10 compostos esteróides.

35. Composição, de acordo com a reivindicação 34,
caracterizada pelo fato de que cada um de C₃₋₃₉-alquil, C₃₋
39-alquenil e C₃₋₃₉-alcadienil é (i) cadeia linear ou
ramificada, e (ii) saturado, monoinsaturado ou di-
15 insaturado.

36. Composição, de acordo com a reivindicação 24,
caracterizada pelo fato de que a porção hidrofílica da
porção anfifílica é selecionada do grupo que consiste em
polietileno glicol, polivinilpirrolidona, e açúcar.

20 37. Composição, de acordo com a reivindicação 24,
caracterizada pelo fato de que o polímero biodegradável é
selecionado do grupo que consiste em um polilactídeo,
poliglicolídeo, policaprolactona, polidioxanona,
policarbonato, polihidroxibutirato, polialquíleno oxalato,
25 polianidrido, poliamida, poliésteramida, poliuretano,
poliacetal, poliortocarbonato, polifosfazeno,
polihidroxivalerato, polialquíleno succinato e
poliortoéster, e copolímeros, copolímeros em bloco,
copolímeros ramificados, terpolímeros e combinações e
30 misturas desses.

38. Composição, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o polímero biodegradável é selecionado do grupo que consiste em um ácido polilático e um ácido poliglicólico, e copolímeros desses.

5 39. Composição, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o solvente orgânico é selecionado do grupo que consiste em N-metil-2-pirrolidona, N,N-dimetilformamida, dimetil sulfóxido, propileno carbonato, caprolactama, triacetina, benzoato de benzila, 10 álcool benzílico, lactato de etila, gliceril triacetato, um éster de ácido cítrico, polietileno glicol, alcoxipolietileno glicol, polietileno glicol acetato, ou qualquer combinação desses.

15 40. Método caracterizado para a formação da composição polimérica líquida farmacêutica da reivindicação 24, que compreende as etapas de: (a) dissolução de um polímero biodegradável insolúvel em água, farmaceuticamente aceitável, em um solvente orgânico farmaceuticamente aceitável para formar uma solução de polímero; e (b) 20 mistura da solução do polímero com uma quantidade eficaz de um polipeptídeo terapêutico conjugado com uma ou mais porções anfifílicas para formar a composição farmacêutica.

25 41. Método caracterizado para a formação de um implante sólido, biodegradável *in-situ* para liberação sustentada de um polipeptídeo terapêutico que compreende a administração da composição polimérica líquida farmacêutica da reivindicação 24 em um local de implante no corpo de um indivíduo.

30 42. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é

administrada por injeção.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que a injeção é por via subcutânea ou intramuscular.

5 44. Método caracterizado para a formação de um implante sólido, biodegradável *in-situ* para liberação sustentada de um polipeptídeo terapêutico que compreende (a) a formação de uma composição polimérica líquida farmacêutica de acordo com Método, de acordo com a 10 reivindicação 40, e (b) administração da composição resultante em um local de implante no corpo de um indivíduo.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é 15 administrada por injeção

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a injeção é por via subcutânea ou intramuscular.

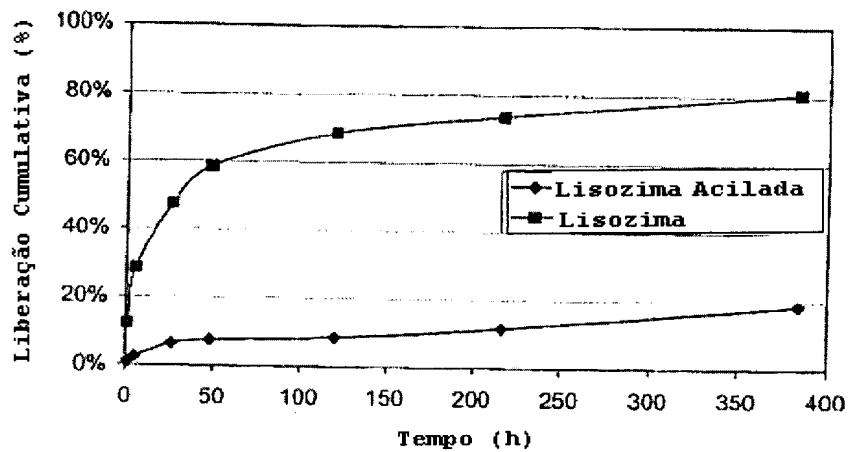


Figura 1

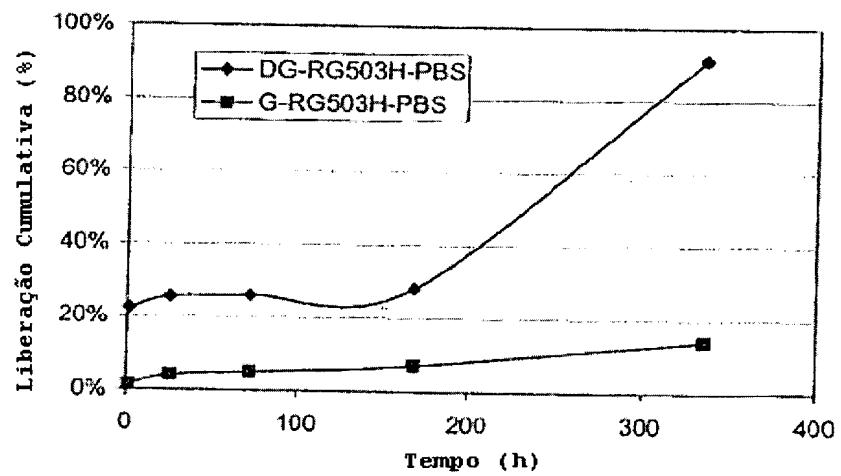


Figura 2

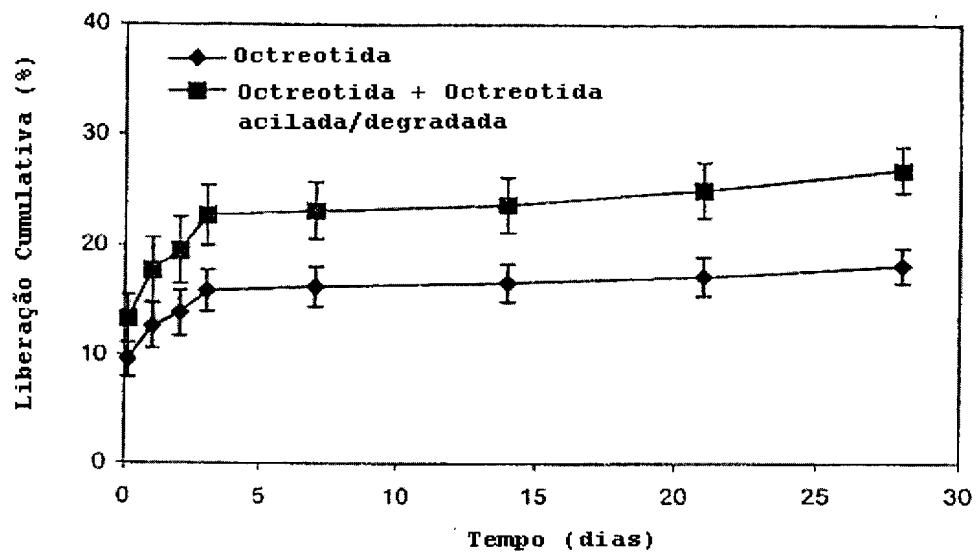


Figura 3

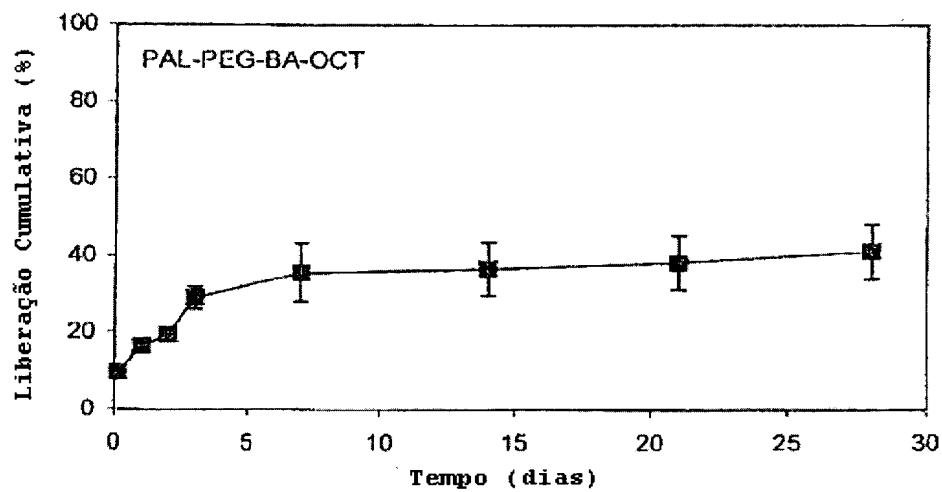


Figura 4

C:\NrPortb\Interwoven\KENT\7753_1.DOC

RESUMO**COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE
PEPTÍDEOS**

A presente invenção fornece métodos de formação de um implante sólido, biodegradável *in-situ* em um corpo por administração de uma composição líquida farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de um polímero biodegradável biocompatível, insolúvel em água e uma quantidade eficaz de um peptídeo terapêutico covalentemente modificado com uma ou mais porções lipofílicas ou anfifílicas, que são dissolvidos ou dispersos em um solvente orgânico biocompatível, hidrossolúvel. Essa invenção também fornece composições e métodos relacionados.