



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: PT 659083 E

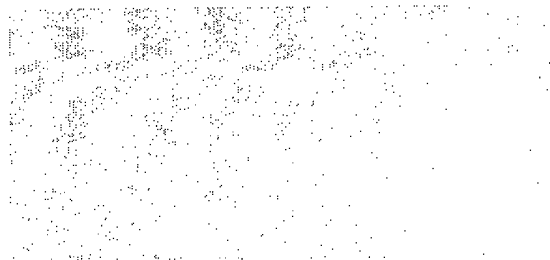
(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)
A61K038/08 A A61K038/22 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1993.06.01	(73) Titular(es): CEPHALON, INC. 145 BRANDYWINE PARKWAY WEST CHESTER, PA 19380 US
(30) Prioridade: 1992.06.12 US 899070 1993.04.16 US 51191	ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MED. OF YESHIVA UNIV. 1300 MORRIS PARK AVENUE BRONX, NY 10461 US
(43) Data de publicação do pedido: 1995.06.28	(72) Inventor(es): STUART C. APFEL US JOHN A. KESSLER US MICHAEL E. LEWIS US
(45) Data e BPI da concessão: 1999.12.22	(74) Mandatário(s): ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) Epígrafe: PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA

(57) Resumo:



DESCRIÇÃO

"Prevenção e tratamento de neuropatia periférica"

Antecedentes do Invento

O presente invento refere-se à utilização de um factor de crescimento semelhante a insulina I para prevenir ou tratar neuropatia periférica.

O factor de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I; somatomedina C) é um membro de uma família de polipéptidos estrutural e funcionalmente relacionados a qual inclui também a insulina e os factores semelhantes a insulina II (IGF-II) e III (IGF-III). Todos estes factores proteicos podem desempenhar um papel no desenvolvimento e manutenção neuronais (Recio-Pinto, E., *et al.*, 1988, *Neurochem. Int.* 12:397-414). Adicionalmente, existem evidências de que os níveis de IGF-I e IGF-II aumentam substancialmente durante a regeneração após corte transversal do nervo ciático (Hansson, H.A., *et al.*, 1986, *Acta Physiol. Scand.*, 126:609-614). Mostrou-se que estes factores promovem a sobrevivência de neurónios sensoriais e simpáticos em cultura (Ishii, D.N., *et al.*, 1987, Em: *Insulin, IGFs and Their Receptors in the Central Nervous System*, eds., Raizada, M.K., *et al.*, Plenum Press, NY, pág. 315-348) e, no caso de IGF-I, promovem a sobrevivência de neurónios corticais (Aizenman, Y., *et al.*, 1987, *Brain Res.*, 406:32-42). Finalmente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o IGF-I e o IGF-II promovem a sobrevivência de neurónios motores e a excrescência de neurites (Caroni, P., *et al.*, 1990, *J. Cell Biol.*, 110:1307-1317).

WO-A-90148338 refere-se a um método para aumentar a sobrevivência de células neuronais num mamífero, estando as referidas células em risco de morte devido a envelhecimento ou a várias doenças degenerativas. Este método compreende a administração de IGF-I ao referido mamífero, mas está limitado a tecidos nervosos do sistema nervoso central. US-A-5068224 divulga a utilização de IGF-I para melhorar a regeneração de nervos periféricos cortados transversalmente mas não divulga nem sugere a utilização deste composto para redução de neuropatia periférica.

Neuropatia periférica refere-se geralmente a um distúrbio que afecte os nervos periféricos, mais frequentemente manifestado como uma disfunção ou uma combinação de disfunções neurais motoras, sensoriais, sensorimotoras ou autónomas. A grande variedade de morfologias exibidas por neuropatias periféricas apenas podem ser atribuídas cada uma a uma variedade igualmente grande de causas. Por exemplo, neuropatias periféricas podem ser geneticamente adquiridas, podem resultar de uma doença sistémica ou podem ser induzidas por um agente tóxico. Alguns agentes tóxicos que causam neurotoxicidades são drogas terapêuticas, agentes antineoplásicos, contaminantes nos alimentos ou medicamentos e poluentes ambientais e industriais.

Em particular, os agentes quimioterapêuticos que se sabe causarem neuropatias sensoriais e/ou motoras incluem a vincristina, uma droga antineoplásica utilizada para tratar malignidades hematológicas e sarcomas. A neurotoxicidade está relacionada com a dose e exibe uma mobilidade intestinal reduzida e neuropatia periférica, especialmente nos músculos distais das mãos e pés, hipotensão postural e atonia da bexiga urinária. Foram documentados problemas semelhantes com taxol e cisplatina (Mollman, J.E., 1990, *New Eng. Jour. Med.* 322:126-127), embora a neurotoxicidade relacionada com a cisplatina possa ser aliviada com factor de crescimento dos nervos (NGF) (Apfel, S.C. *et al.*, 1992, *Annals of Neurology* 31:76-80). Embora a neurotoxicidade seja por vezes reversível após remoção do agente neurotóxico, a recuperação pode ser um processo muito lento (Legha, S., 1986, *Medical Toxicology* 1:421-427; Olesen, *et al.*, 1991, *Drug Safety* 6:302-314).

Existem várias neuropatias periféricas hereditárias, incluindo: doença de Refsum, abetalipoproteinemia, doença de Tangier, doença de Krabbe, leucodistrofia metacromática, doença de Fabry, síndrome de Dejerine-Sottas e outras. De todas as neuropatias herdadas, a mais comum é de longe a Doença de Charcot-Marie-Tooth.

A Doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (também conhecida como Atrofia Muscular Peronial ou Neuropatia Sensorial Motora Hereditária (HMSN)) é o distúrbio neurológico hereditário mais comum. É caracterizada por fraqueza e atrofia, inicialmente dos músculos peroniais, devido a desmielinização



segmentar dos nervos periféricos e degeneração associada dos axónios e células do corno anterior. A herança autossómica dominante é normal e distúrbios degenerativos do SNC associados, tais como ataxia de Friedreich, são comuns.

Existem duas formas primárias da Doença de CMT. Pensava-se que o Tipo I (70% dos casos) tinha como patofisiologia inicial a desmielinização, mas o envolvimento clínico distal sugere uma degeneração axónica primária, tal como no Tipo II. O Tipo II (30% dos casos) é inicialmente uma degeneração axónica sem desmielinização e pode não ser tão grave como o Tipo I. A diminuição da condução nervosa está frequentemente presente no nascimento, embora este não seja um indicador da possível idade de despoletar ou da gravidade da progressão. Existem também formas muito raras, Tipo III e Tipo IV, as quais estão ligadas recessivamente.

Sumário do Invento

O invento apresenta um método para redução de uma neuropatia periférica que não seja causada por um nível anormal de insulina num mamífero. Este método envolve a administração ao mamífero de uma quantidade redutora de neuropatia de factor de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) ou factor de crescimento semelhante a insulina III (IGF-III).

Em várias concretizações preferidas, o mamífero é um humano ou um mamífero agrícola ou doméstico que desenvolva uma neuropatia, p. ex., como resultado de tratamento de um neoplasma com um agente quimioterapêutico. O IGF-I ou IGF-III pode ser administrado de uma forma estimada como eficaz por um perito na arte; os modos de administração preferidos são a administração intravenosa e injeção subcutânea.

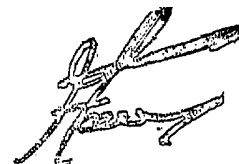
Tal como aqui utilizado, "neuropatia periférica " refere-se a um distúrbio que afecta um segmento do sistema nervoso periférico. O invento envolve a utilização de IGF-I ou IGF-III, membros da família da insulina de factores de crescimento, para reduzir uma neurotoxicidade que não seja obviamente ou directamente causada por um nível anormal de insulina, incluindo, mas não se limitando a, neuropatia sensorimotora distal ou neuropatias autónomas tais como a mobilidade reduzida do tracto gastrointestinal ou atonia da bexiga

urinária. As neuropatias preferidas que podem ser eficazmente tratadas com IGF-I ou IGF-III incluem neuropatias associadas a doença sistémica, p. ex., síndrome pós-poliomielite; neuropatias geneticamente adquiridas, p. ex., doença de Charcot-Marie-Tooth; e neuropatias causadas por um agente tóxico, p. ex., um agente quimioterapêutico, de preferência vincristina.

Quando se utiliza IGF-I ou IGF-III para tratar uma neuropatia induzida por um agente tóxico, este pode ser administrado antes, simultaneamente ou após a exposição ao agente tóxico, ou antes, durante ou após a administração de um quimioterapêutico. De preferência, o IGF-I e o agente quimioterapêutico são cada um administrados a intervalos de tempo eficazes, durante um período de tratamento com sobreposição. O IGF-I ou IGF-III pode ser administrado ao mamífero após a exposição ao agente neurotóxico ou após a quimioterapia, para restaurar pelo menos uma porção da função neuronal destruída pelo agente neurotóxico ou quimioterapêutico. O quimioterapêutico pode ser qualquer agente quimioterapêutico que cause neurotoxicidade, de preferência vincristina, taxol, didesoxiinosina ou cisplatina. Num exemplo preferido, a proporção de peso para peso de IGF-I ou IGF-III (des-(1-3)-IGF-I) para vincristina é de entre 1:400 e 75:1, de preferência entre 1:40 e 8:1.

Quando IGF-I e um agente quimioterapêutico são administrados simultaneamente, o invento apresenta uma composição que inclui um IGF-I substancialmente puro e um agente quimioterapêutico, numa proporção de peso para peso entre 1:400 e 75:1. O agente quimioterapêutico é de preferência vincristina, cisplatina, didesoxiinosina ou taxol. O termo "substancialmente puro", tal como aqui utilizado, refere-se a IGF-I ou IGF-III que, antes de ser misturado com outro o componente da composição, é pelo menos 50% (em peso) da proteína presente na preparação. Em concretizações preferidas, pelo menos 75%, de preferência pelo menos 90%, sendo preferível pelo menos 99% (em peso) da proteína presente na preparação é IGF-I ou IGF-III. Com maior preferência, o IGF-I ou IGF-III utilizado na composição do invento é puro tal como avaliado por análise da sequência de aminoácidos do terminal amino.

Por "agente tóxico", ou agente neurotóxico, entenda-se uma substância que, através da sua acção química, fira, diminua ou iniba a actividade de um componente do sistema nervoso. A lista de agentes neurotóxicos que causam



neuropatias é extensa e inclui, mas não se limita a, agentes neoplásicos tais como vincristina, vinblastina, cisplatina, taxol ou compostos didesoxi, p. ex., didesoxiinosina; álcool; metais; toxinas industriais envolvidas em exposição ocupacional ou ambiental; contaminantes de alimentos ou medicamentos; ou sobre-dosagens de vitaminas ou drogas terapêuticas, p. ex., antibióticos tais como penicilina ou cloranfenicol, ou mega-dosagens de vitaminas A, D ou B6. Uma lista extensa embora incompleta de compostos químicos com efeitos secundários neurotóxicos encontra-se na Tabela 5. Embora esta lista proporcione exemplos de compostos neurotóxicos, pretende-se que esta exemplifique o invento e não que limite o seu âmbito. Outros agentes tóxicos podem causar neuropatias e podem ser caracterizados por métodos conhecidos dos peritos na arte. Por "exposição a um agente tóxico" entenda-se que o agente tóxico é disponibilizado a, ou posto em contacto com, um mamífero do invento. A exposição a um agente tóxico pode ocorrer por administração directa, p. ex., por ingestão ou administração de um alimento, medicamento ou agente terapêutico, p. ex., um agente quimioterapêutico, por contaminação accidental ou por exposição ambiental, p. ex., exposição aérea ou aquosa.

Os termos IGF-I e IGF-III incluem fragmentos ou análogos destes que exibem a actividade biológica do invento, i.e., a capacidade para reduzir uma neuropatia induzida por um agente tóxico. Os métodos para determinar se um fragmento de IGF-I ou IGF-III ou análogo destes possui a actividade biológica do invento são descritos abaixo. Geralmente, os análogos ou fragmentos adequados partilharão pelo menos 65% de homologia com o IGF-I ou IGF-III de ocorrência natural. Os polipéptidos-fragmento de IGF-I ou IGF-III são subconjuntos das moléculas de IGF-I ou IGF-III (respectivamente), contendo menos resíduos de aminoácidos que as moléculas nativas. Tal como aqui utilizado, um fragmento de IGF-I ou IGF-III pode ter normalmente pelo menos cerca de 5 aminoácidos contíguos e pode ter pelo menos cerca de 30-40 aminoácidos de comprimento, de preferência cerca de 50-65 aminoácidos de comprimento. As sequências preferidas têm 6-25 resíduos. Uma porção dos aminoácidos do fragmento pode ser substituída por substituições ou deleções conservativas as quais melhoram a estabilidade química ou biológica dos péptidos-produto. De preferência, não mais que 35%, sendo preferível não mais que 20% dos resíduos de aminoácidos são substituídos ou delecionados. Os seguintes exemplos de sequências de IGF-I preferidas estão no âmbito do

invento: 1) IGF-I (55-70) (SEQ ID NO: 1), descrita num pedido de patente co-propriedade de Lewis *et al.* USSN 07/869913; e 2) IGF-I R³ comprida, a qual é uma proteína de fusão que consiste em IGF-I humano com um péptido de extensão de 13 aminoácidos no terminal N e a substituição de Glu por Arg na posição 3 (Francis, G.L., *et al.* 1992. Art to Sci. in Tissue Culture. HyClone Laboratories, Inc. 11:3-7; GROPEP PTY.LTD. Ped. PCT WO89/05822; Patente US N° 5164370; PCT /AU90/00210). Os fragmentos peptídicos aqui listados são apenas exemplos e não limitam o âmbito de fragmentos peptídicos de IGF-I úteis no invento.

"Homologia", tal como aqui utilizado, refere-se à semelhança de sequências entre duas moléculas polipeptídicas. Quando uma posição em ambas as duas sequências comparadas é ocupada pela mesma sub-unidade monomérica de aminoácido, p. ex., se uma posição em cada uma das duas moléculas polipeptídicas for ocupada por uma lisina, então as moléculas são homólogas nessa posição. A homologia entre duas sequências é uma função do número de posições coincidentes ou homólogas partilhadas pelas duas sequências. Por exemplo, se 6 das 10 posições em duas sequências são coincidentes ou homólogas, então as duas sequências são 60% homólogas. Por exemplo, as sequências de aminoácidos LTVSFR e LPVSAT partilham 50% de homologia.

Um análogo de IGF-I ou IGF-III pode ser diferente de um IGF-I ou IGF-III de ocorrência natural através de diferenças conservativas nas sequências de aminoácidos ou através de modificações que não afectem a sequência ou através de ambas. As modificações incluem derivação química de polipéptidos, p. ex., acetilação, carboxilação, glicosilação ou fosforilação; substituição ou deleção de resíduos de aminoácido que alterem a afinidade de proteínas de ligação mas que não alterem substancialmente a afinidade para o receptor e/ou alterem a actividade biológica do polipéptido; ou alterações químicas no polipéptido que aumentem a estabilidade polipeptídica.

Apesar das largamente diversas morfologias e causas atribuídas às neuropatias periféricas *in vivo*, as requerentes formularam a hipótese de que o IGF-I pode ser um meio eficaz de prevenção ou tratamento de tais neuropatias num mamífero, apesar do facto destas neuropatias não poderem ser

directamente ou obviamente ligadas a uma deficiência em, ou de outra forma a um nível anormal de, insulina. Para ilustrar isto, as requerentes mostraram que a administração de IGF-I a animais aos quais foi dada uma droga com efeitos secundários neurotóxicos, i.e., a droga anti-tumoral vincristina, reduz a neurotoxicidade associada. Esta verificação não só alivia o efeito secundário neurotóxico, como pode também aumentar substancialmente a utilização de vincristina como agente anti-tumoral. A utilização de vincristina, um quimioterapêutico de outra forma eficaz, esteve até aqui limitada pela neurotoxicidade acompanhante. Esta verificação podia também aumentar de forma semelhante a utilização de outros compostos limitados por problemas neurotóxicos. A co-administração de IGF-I ou IGF-III pode diminuir a ocorrência destas neuropatias periféricas acompanhantes.

Outras características e vantagens do invento serão patentes a partir da seguinte descrição das concretizações preferidas e a partir das reivindicações.

Descrição Detalhada

Serão primeiro descritos os desenhos.

Desenhos

A Fig. 1 é um gráfico de barras que mostra o efeito do rhIGF-I na função motora após tratamento com vincristina.

A Fig. 2 é um gráfico de barras que mostra o efeito de rhIGF-I na função do nervo tibial após tratamento com vincristina.

A Fig. 3 é um gráfico de barras que mostra o efeito de rhIGF-I na função do nervo caudal após tratamento com vincristina.

A Fig. 4 é um gráfico de barras que mostra o efeito de taxol e rhIGF-I em latências no movimento da cauda.

A Fig. 5 é um gráfico de barras que mostra o efeito de taxol e rhIGF-I em latências sobre placa quente.

Descrição do Invento

Ocorreu às requerentes que IGF-I, bem como proteínas e péptidos relacionados com IGF-I, poderiam promover o funcionamento e/ou sobrevivência de neurónios de outra forma em risco de perda de função e/ou morte devido à exposição a agentes tóxicos. Para testar especificamente esta ideia, as requerentes investigaram se a administração de IGF-I é capaz de prevenir a neurotoxicidade resultante da administração do agente anti-tumoral vincristina num modelo animal. Clinicamente, a utilidade de vincristina é limitada pela ocorrência de polineuropatia com disfunção motora proeminente, bem como anormalidades sensoriais e autónomas (Legha, S.S., *supra*). Até à data, não existe qualquer meio eficaz para prevenir esta neuropatia a não ser limitando a dose de vincristina. As requerentes demonstraram que a administração de IGF-I é capaz de prevenir este efeito secundário debilitante e limitante da dose da vincristina.

Num segundo teste desta ideia, os requerentes investigaram se a administração de IGF-I é capaz de prevenir a neurotoxicidade resultante da administração do agente anti-tumoral taxol num modelo animal.

Exemplo Experimental: Vincristina

Métodos

Administrações de Drogas

O sulfato de vincristina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) foi administrado intraperitonealmente numa dose de 2 mg/kg duas vezes por semana durante seis semanas consecutivas. Foi formulado a uma concentração de 0,16 mg/ml de solução salina normal.

O IGF-I recombinante (rhIGF-I) para utilização experimental foi proporcionado por Cephalon Inc. (West Chester, PA) e está também comercialmente disponível em RD Systems, Inc. (Minneapolis, MN), U.B.I. (Lake Placid, NY) e Kabi Pharmacia AS (Estocolmo, Suécia). O rhIGF-I foi formulado para o grupo de dose elevada a uma concentração de 1 mg/ml e para o grupo de dose baixa a uma concentração de 0,3 mg/ml, numa solução tampão de ácido



acético com um pH de 6,0. Os grupos de doses elevadas (Grupos 4 e 6) receberam subcutaneamente 1,0 mg/kg de IGF-I três vezes por semana durante seis semanas consecutivas. Os grupos tratados com doses baixas (Grupos 3 e 5) receberam subcutaneamente 0,3 mg/kg de IGF-I três vezes por semana durante o mesmo período de tempo. Os grupos que não receberam IGF-I receberam injeções subcutâneas do veículo tampão de ácido acético no mesmo volume por peso e de acordo com a mesma calendarização, tal como os animais que receberam IGF-I.

Animais

Foram seleccionados para este estudo ratinhos macho CD1 pesando entre 15-20 g no início. Estes foram distribuídos ao acaso, 12 animais por cada um dos seguintes grupos de tratamento:

Grupo #1: Controlo, apenas injeções de veículo.

Grupo #2: Vincristina mais veículo de IGF-I.

Grupo #3: Vincristina mais IGF-I a uma dose baixa.

Grupo #4: Vincristina mais IGF-I a uma dose levada.

Grupo #5: IGF-I a uma dose baixa sozinho.

Grupo #6: IGF-I a uma dose elevada sozinho.

Teste Comportamental

Teste de inclinação: Após 6 semanas de tratamento, os ratinhos foram testados em modo de ocultação. Para este teste cada ratinho foi colocado individualmente numa tábua de esferovite, a qual foi então levantada para uma posição vertical. Os animais foram cronometrados quanto ao tempo durante o qual conseguiam manter a sua força na tábua sem caírem. O teste foi arbitrariamente parado após 30 segundos. Foi registado o melhor tempo de três ensaios.

Teste Electrofisiológico

Após o teste comportamental, os ratinhos foram sujeitos ao teste electrofisiológico. Cada ratinho foi anestesiado com halotano antes do registo. Foram medidas as amplitudes do composto e latências distais no nervo caudal da cauda. As caudas foram refreadas e foram colocados eléctrodos superficiais de agulha de platina-irídio ao longo da secção distal do nervo caudal. O eléctrodo de registo activo foi posicionado a uma distância fixa de 40 mm distal

em relação ao cátodo de estimulação. Foram distribuídos breves pulsos de estimulação de voltagem constante através de um par ânodo-cátodo posicionado em sobreposição com uma secção proximal do nervo caudal. Foram conduzidos ortodromicamente registos motores a partir do nervo tibial com colocação do eléctrodo sobre a inserção distal do músculo gastrocnémio. Foram conduzidos ortodromicamente registos sensoriais a partir do nervo sural com uma distância de 10 mm entre os eléctrodos. Para cada registo foi feita a média de cinco a dez estímulos e o procedimento foi repetido. A latência foi determinada a partir do início da despolarização inicial e foi medida até ao 0,1 ms mais próximo. A amplitude foi medida a partir da linha de base até ao pico e foi medida até ao 0,1 μ V mais próximo. A temperatura rectal de cada ratinho foi monitorizada e mantida num intervalo de 0,5°C.

Estatística

Os dados foram analisados utilizando uma análise de variância (ANOVA) em todos os casos.

Resultados

Teste comportamental

Clinicamente, a vincristina causa uma neuropatia mista sensorimotora, com fraqueza motora distal como sinal precoce mais proeminente. Utilizámos por isso um teste comportamental simples para determinar a resistência motora dos animais em cada grupo. Os dados do teste de inclinação estão resumidos na Tabela 1 e na Fig. 1. Os animais tratados apenas com vincristina foram capazes de manter a sua força durante apenas metade do tempo máximo. Os outros grupos testados foram todos capazes de manter as suas forças durante aproximadamente os 30 segundos permitidos. O grupo tratado apenas com vincristina diferiu dos outros grupos com uma $p < 0,0001$ por ANOVA.

Resultados electrofisiológicos

A condução motora foi medida a partir do nervo tibial e os resultados estão resumidos na Tabela 2 e na Fig. 2. O grupo tratado apenas com vincristina teve uma latência prolongada e uma amplitude do potencial de acção significativamente reduzida em comparação com o grupo de controlo ($p < 0,02$ por ANOVA). Os grupos co-tratados com IGF-I não diferiram significativamente do grupo de controlo.



Os registos dos compostos foram conduzidos a partir do nervo caudal na cauda e os resultados estão resumidos na Tabela 3 e na Fig. 3. Também aqui, o grupo tratado apenas com vincristina teve latências significativamente prolongadas e amplitudes reduzidas ($p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente). Em cada um dos casos a administração de IGF-I melhorou parcialmente embora não completamente estes valores.

Os registos sensoriais foram conduzidos a partir do nervo sural e os valores estão resumidos na Tabela 4. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre qualquer um dos grupos tal como determinado por esta medição de função puramente sensorial.

Os dados apresentados indicam que a co-administração de IGF-I com vincristina pode prevenir as manifestações de neuropatia por vincristina observadas neste modelo animal. As requerentes demonstraram a presença de neuropatia utilizando ambas as medições comportamental e electrofisiológica. Este modelo animal de neuropatia por vincristina parece correlacionar-se bem com a condição clínica humana no que diz respeito à disfunção motora ser a manifestação mais proeminente. Sempre que a administração de vincristina prejudicava a função do nervo periférico, a administração de IGF-I resultou numa melhoria significativa.

Exemplo Experimental: Taxol

Para avaliar se rhIGF-I podia prevenir o desenvolvimento de uma neuropatia sensorial causada pela administração de taxol, foi dada a ratinhos CD-1 macho uma dose diária de taxol (21,6 mg/kg) administrada intraperitonealmente durante 6 dias em veículo de taxol (cromóforo EL a 12% (Sigma, St. Louis MO), solução salina tamponada com fosfato a 76%, etanol a 12%). O veículo de rhIGF-I (ácido acético 100 mM, NaCl 50 mM, albumina de soro bovino a 1%) ou o rhIGF-I (1 mg/kg) foi administrado subcutaneamente durante 10 dias começando um dia antes do início das injeções de taxol. No último dia da administração de veículo de IGF-I ou de IGF-I, a capacidade dos ratinhos para sentirem e responderem a um estímulo nocivo foi avaliada determinando as latências em placa quente (55°C) e dos movimentos da cauda

(D'Amour *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 72:74-79, 1941; Eddy *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107:385-393, 1953; Vaught *et al. Life Sci.* 48:2233-2241, 1991). As latências em placa quente e dos movimentos da cauda foram determinadas duas vezes para cada ratinho. O tempo que levaram até lamberem uma pata traseira ou agitarem a pata traseira três vezes no ensaio da placa quente foi de 20 s e para moverem a cauda de um rolo aquecido no ensaio do movimento da cauda o tempo foi de 10 s. Foram determinadas diferenças significativas entre os grupos de tratamento com veículo e com taxol através do teste t de Dunnett (Tallarida *et al. Manual of Pharmacologic Calculation with Computer Programs*, 2ª ed. Springer-Verlag, NY, págs. 145-148, 1987) e diferenças entre todos os grupos através de um teste de Newman-Keul (Tallarida *et al. supra*, págs. 121-125).

Apenas os ratinhos tratados com taxol/veículo de rhIGF-I tinham latências do movimento da cauda e em placa quente que eram significativamente superiores às dos ratinhos tratados com veículo. O taxol aumentou significativamente as latências do movimento da cauda e em placa quente 43% e 37%, respectivamente. Adicionalmente, as latências do movimento da cauda e em placa quente para os ratinhos tratados com taxol eram também significativamente superiores às dos ratinhos tratados com rhIGF-I ou taxol/rhIGF-I. Assim, rhIGF-I preveniu o desenvolvimento de uma neuropatia sensorial tal como medido por alterações nas latências do movimento da cauda e em placa quente.

O efeito da administração de rhIGF-I na prevenção de neuropatia induzida por taxol é mostrado na Tabela 6, na Fig. 4 (latências do movimento da cauda) e na Fig. 5 (latências em placa quente). Os resultados são apresentados como média + S.E.M.. O símbolo * significa que o valor é significativamente diferente de ambos os grupos tratados com veículos de rhIGF-I sozinho e com taxol/rhIGF-I, $p < 0,05$.

Terapia

Qualquer um dos agentes redutores de neuropatias de IGF-I aqui descritos podem ser administrados a um doente num tampão farmacologicamente aceitável (p. ex., solução salina fisiológica ou tampão de ácido acético). Embora possa ser conveniente administrar IGF-I ou IGF-III subcutaneamente, oralmente,

nasalmente ou topicamente, p. ex., na forma de um líquido ou de uma pulverização, a preparação terapêutica é administrada de acordo com a condição a ser tratada. Por exemplo, pode ser necessário administrar IGF-I intravenosamente ou cirurgicamente ao tecido apropriado ou através de um cateter.

Uma dosagem apropriada é uma quantidade de um factor de crescimento semelhante a insulina I, fragmento ou análogo, que efectue uma redução na extensão da neuropatia. O IGF-I, por exemplo, pode ser administrado em dosagens de 0,03-10 mg/kg/dose unitária, como bolo ou por infusão, administrado diariamente, intermitentemente ou de acordo com a necessidade. Esta dosagem corresponde aproximadamente à proporção de peso para peso de IGF-I para vincristina de entre 1:400 e 75:1, de preferência de 1:40 a 8:1. Podem ser determinadas por um perito na arte dosagens de outros factores de crescimento semelhantes a insulina I, fragmentos ou análogos, ou as suas proporções em peso relativamente ao agente tóxico em questão, de acordo com os métodos aqui descritos.

A eficácia do tratamento de neuropatias com IGF-I pode ser avaliada pelos seguintes sinais de recuperação: 1) Recuperação da função sensorial normal, a qual pode ser avaliada pela sensibilidade térmica das extremidades; 2) Recuperação da função motora normal, a qual pode ser avaliada por medições da fraqueza muscular, bom controlo motor e bons reflexos dos tendões; e 3) Normalização da velocidade de condução nervosa, a qual é avaliada electrofisiologicamente. Os métodos para avaliar uma neuropatia periférica são descritos por Asbury *et al.* (Asbury *et al.*, 1992, em Diseases of the Nervous System, Clinical Neurobiology, eds. Asbury *et al.* W.B. Saunders Inc. Philadelphia, PA. 1:252-269) e podem ser empregues por peritos na arte para determinar a eficácia de um factor de crescimento semelhante a insulina I no alívio de neuropatia.

Outras Concretizações

Outras concretizações estão nas reivindicações que se seguem. Por exemplo, os agentes úteis na redução de neuropatia tóxica podem incluir qualquer uma das famílias de factores de crescimento semelhante a insulina I e

neurotrofinas relacionadas, moléculas estimuladoras do factor de crescimentos dos nervos, factor neurotrófico ciliar, fragmentos peptídicos derivados de IGF-I, análogos de um factor de crescimentos semelhante a insulina I ou combinações destes agentes.

Enquanto que a neurotoxicidade por vincristina manifesta-se tipicamente como uma neuropatia periférica, o método do invento pode também ser utilizado para reduzir outras neuropatias tóxicas, p. ex., neuropatias dos sistemas nervosos autónomo ou craniano e pode ser utilizado para mitigar os efeitos de outros agentes tóxicos.

O invento inclui ainda neuropatias associadas a doenças sistémicas: uremia, doença hepática colestática da infância, insuficiência respiratória crónica, polineuropatia alcoólica, falha múltipla de órgãos, septicemia, hipoalbuminemia, síndrome de eosinofilia-mialgia, hepatite, porfíria, hipoglicémia, deficiência vitamínica, doença hepática crónica, cirrose biliar primária, hiperlipidemia, lepra, doença de Lyme, herpes zoster, síndrome de Guillain-Barre, polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória crónica, polineurite sensorial, neuropatia associada ao síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), síndrome de Sjogren, vasculite primária (tal como poliartrite nodosa), angéite granulomatosa alérgica (Churg-Strauss), angéite por hipersensibilidade, granulomatose de Wegener, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistémico, doença mista do tecido conjuntivo, esclerodermia, sarcoidose, vasculite, vasculitides sistémicas, polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda, síndrome pós-poliomielite, síndrome do túnel cárpico, pandisautonomia, amiloidose sistémica primária, hipotiroidismo, doença pulmonar crónica obstrutiva, acromegalia, malabsorção (espru, doença celíaca), carcinomas (sensoriais, sensorimotores, tardios e desmielinizantes), linfoma (incluindo de Hodgkin), policitemia vera, mieloma múltiplo (do tipo lítico, plasmacitoma osteosclerótico ou solitário), gamopatia monoclonal benigna, macroglobulinemia, e crioglobulinemia, tal como descrito por Asbury *et al. supra*.

O invento inclui também neuropatias geneticamente adquiridas: atrofia muscular peronial (Doença de Charcot-Marie-Tooth, tipos I, II e X), neuropatias amilóides hereditárias, neuropatia sensorial hereditária (tipo I e tipo II),

neuropatia porfírica, propensão hereditária para paralisia por pressão, doença de Fabry, adrenomieloneuropatia, síndrome de Riley-Day, neuropatia de Dejerine-Sottas (neuropatia hereditária motora-sensorial III), doença de Refsum, ataxia-telangiectasia, tirosinemia hereditária, anafalipoproteinemia, abetalipoproteinemia, neuropatia axónica gigante, leucodistrofia metacromática, leucodistrofia celular globular, e ataxia de Friedrich (Asbury *et al. supra*). Estão também incluídas no invento mononeuropatia múltipla, plexopatia e neuropatia motora pura, tal como descrito por Asbury *et al. supra*.

TABELA 1
TESTE DE INCLINAÇÃO (s)

GRUPO	MÉDIAS	S.E.M.
CONTROLO	27,6	2,4
VIN SOZINHA	15,4*	6,5
VIN + IGF BAIXO	30	0
VIN + IGF ELEVADO	27,7	2,3
IGF BAIXO	30	0
IGF ELEVADO	27	3

Dados do teste de inclinação. Os valores representam o tempo que os animais conseguiram permanecer suspensos com uma inclinação vertical, com um máximo estabelecido em 30 segundos.

* Significa que este valor difere dos outros grupos com uma $p < 0,0001$.

(Segue Tabela)



TABELA 2

NERVO MOTOR TIBIAL

GRUPO	LATÊNCIA (ms)		AMPLITUDE (mV)	
	MÉDIA	S.E.M.	MÉDIA	S.E.M.
CONTROLO	1,21	0,03	22,98	1,06
VIN SOZINHA	1,35	0,05	13,94*	2,11
VIN + IGF BAIXO	1,38	0,05	17,12	1,53
VIN + IGF ELEVADO	1,43	0,08	18,48	1,89
IGF BAIXO	1,21	0,02	19,8	1,81
IGF ELEVADO	1,23	0,03	20,76	1,47

Medições electrofisiológicas a partir do nervo tibial.

* Significa que este grupo difere do controlo com uma $p < 0,02$.

TABELA 3

NERVO COMPOSTO CAUDAL

GRUPO	LATÊNCIA (ms)		AMPLITUDE (mV)	
	MÉDIA	S.E.M.	MÉDIA	S.E.M.
CONTROLO	1,39	0,03	57,32	3,47
VIN SOZINHA	1,74**	0,09	30,66*	8,56
VIN + IGF BAIXO	1,55*	0,03	37,01*	2,59
VIN + IGF ELEVADO	1,58*	0,03	36,05*	1,65
IGF BAIXO	1,46	0,03	55,93	5,68
IGF ELEVADO	1,45	0,03	51,96	4,25

Medições electrofisiológicas a partir do nervo caudal.

* Significa que estes valores diferem do controlo com uma $p < 0,05$.

** Significa que este valor difere do controlo com uma $p < 0,001$.



TABELA 4
NERVO SENSORIAL SURAL

GRUPO	LATÊNCIA (ms)		AMPLITUDE (mV)	
	MÉDIA	S.E.M.	MÉDIA	S.E.M.
CONTROLO	0,54	0,01	35,29	3,55
VIN SOZINHA	0,62	0,04	55,66	7,46
VIN + IGF BAIXO	0,61	0,02	44,49	7,09
VIN + IGF ELEVADO	0,57	0,03	37,27	5,4
IGF BAIXO	0,55	0,02	30,52	3,34
IGF ELEVADO	0,5	0,02	43,06	7,73

Medições electrofisiológicas a partir do nervo sural. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

(Segue Tabela)



TABELA 5
AGENTES QUE CAUSAM NEUROPATIA PERIFÉRICA

AGENTE	ATIVIDADE
acetozolamida	diurético
acrilamida	flocoso, agente espessante
adriamicina	antineoplásico
álcool (etanol)	solvente, droga recreativa
almitrina	estimulante respiratório
amiodarona	antiarrítmico
anfotericina	antimicrobiano
arsénico	herbicida, inseticida
aurotioglucose	anti-reumático
barbitúricos	anticonvulsivo, sedativo
espinheiro-cerval	baga tóxica
carbamatos	inseticida
dissulfureto de carbono (cs ₂)	industrial
cloranfenicol	antibacteriano
cloroquina	antimalárico
colestiramina	anti-hiperlipoproteinémico
cisplatina	antineoplásico
clioquinol	amebicida, antibacteriano
colestipol	anti-hiperlipoproteinémico
colchicina	supressor de gota
colistina	antimicrobiano
ciclo-serina	antibacteriano
citarabina	antineoplásico
dapsona	dermatológico incluindo lepra
didesoxicidina	antineoplásico
didesoxiinosina	antineoplásico
didesoxitimidina	anti-viral
disulfiram	anti-álcool
doxorrubicina	antineoplásico
etambutol	antibacteriano
etionamida	antibacteriano
glutetimida	sedativo, hipnótico
ouro	anti-reumático
hexacarbonos	solventes
contraceptivos hormonais	
hexametilmelamina	à prova de fogo, à prova de rugas
hidralazina	anti-hipertensivo
hidroxicloroquina	anti-reumático



TABELA 5 (Cont.)

AGENTE	ATIVIDADE
imipramina	anti-depressivo
indometacina	anti-inflamatório
chumbo inorgânico	metal tóxico em tintas, etc.
isoniazida	anti-tuberculoso
lítio	anti-depressivo
metilmercúrio	desperdício industrial
metformina	anti-diabético
metil-hidrazina	intermediário sintético
metronidazolo	anti-protozoários
misonidazolo	radio-sensibilizador
nitrofurantoína	anti-séptico urinário
mustarda de azoto	antineoplásico, gás de nervos
óxido nitroso	anestésico
organofosfatos	insecticidas
ospolot	anticonvulsivo
penicilina	antibacteriano
per-hexilina	antiarrítmico
maleato de per-hexilina	antiarrítmico
fenitoína	anticonvulsivo
platina	componente de drogas
primidona	anticonvulsivo
procarbazina	antineoplásico
piridoxina	vitamina b6
cianato de sódio	anti-enjôo
estreptomina	antimicrobiano
sulfonamidas	antimicrobiano
suramin	antineoplásico
tamoxifeno	antineoplásico
taxol	antineoplásico
talidomida	anti-lepra
tálio	veneno de ratos
triantereno	diurético
trimetilestanho	metal tóxico
l-triptofano	aditivo de comida saudável
vincristina	antineoplásico
vinblastina	antineoplásico
vindesina	antineoplásico
vitamina a	mega-dosagens
vitamina d	mega-dosagens

TABELA 6

EFEITO DE TAXOL E rhIGF-I NAS LATÊNCIAS DO MOVIMENTO DA CAUDA E EM PLACA QUENTE

Tratamento ^{a,b}	LATÊNCIA DO MOVIMENTO DA CAUDA (s)	LATÊNCIA EM PLACA QUENTE (s)
Veículo de rhIGF-I	3,49 ± 0,15	8,72 ± 0,40
Veículo de Taxol	3,70 ± 0,30	7,34 ± 0,44
rhIGF-I (1 mg/kg)	3,43 ± 0,14	8,10 ± 0,39
Taxol/Veículo de rhIGF-I	4,99 ± 0,15*	11,96 ± 0,54*
Taxol/rhIGF-I	3,70 ± 0,19	7,74 ± 0,61

* Significativamente diferente dos grupos tratados com veículo, rhIGF-I ou Taxol/rhIGF-I, $p < 0,05$.

^a Veículo de rhIGF-I: O veículo utilizado para IGF-I foi administrado a um grupo de animais para servir como grupo de controlo, sem o rhIGF-I.

Veículo de Taxol: O veículo utilizado para Taxol foi administrado a um grupo de animais para servir como grupo de controlo, sem o Taxol.

rhIGF-I (1 mg/kg): rhIGF-I no seu veículo foi administrado tal como descrito.

Taxol/Veículo de IGF-I: Foi administrado taxol no seu veículo a um grupo de animais simultaneamente com o veículo para IGF-I, mas sem o rhIGF-I.

Taxol/rhIGF-I: Ambos taxol no seu veículo e rhIGF-I no seu veículo foram administrados tal como descrito.

^b Os grupos de controlo de veículo são rotineiramente efectuados para assegurar que o veículo que transporta o agente a ser testado não tem efeitos por si só.



LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL

(i) REQUERENTE: Cephalon, Inc.
Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva
University

(ii) TÍTULO DO INVENTO: PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE
NEUROPATIA PERIFÉRICA

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 1

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

- (A) DESTINATÁRIO: Fish & Richardson
- (B) RUA: 225 Franklin Street
- (C) CIDADE: Boston
- (D) ESTADO: Massachusetts
- (E) PAÍS: EUA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 02110-2804

(v) FORMATO LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: Disquete de 3,5", 1,44 Mb
- (B) COMPUTADOR: IBM PS/2 Modelo 50Z ou 55SX
- (C) SISTEMA OPERATIVO: IBM P.C. DOS (Versão 3.30)
- (D) PROGRAMA: WordPerfect (Versão 5.0)

(vi) DADOS DO ACTUAL PEDIDO:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO:
- (B) DATA DE APRESENTAÇÃO:
- (C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO: 07/899070
- (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 12 de Junho de 1992

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:

- (A) NOME: Paul T. Clark
- (B) NÚMERO DE REGISTO: 30162
- (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/CERTIFICADO: 02655/026001

(ix) INFORMAÇÃO SOBRE TELECOMUNICAÇÕES:

- (A) TELEFONE: (617) 542-5070
- (B) TELEFAX: (617) 542-8906
- (C) TELEX: 200154

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 16
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA:
- (D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys
Ser
Ala

Lisboa, 23. FEV. 2000

Por CEPHALON, INC. e ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF
MEDICINE OF YESHIVA UNIVERSITY

- O AGENTE OFICIAL -

○ ADJUNTO



ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA



REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de factor de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) ou factor de crescimento semelhante a insulina III (IGF-III) para o fabrico de um medicamento para reduzir uma neuropatia periférica que não seja causada por um nível anormal de insulina num mamífero.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o medicamento é adaptado para ser administrado intravenosamente ou subcutaneamente.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que a neuropatia está associada a uma doença sistémica, ou é síndrome pós-poliomielite, neuropatia hereditária ou Doença de Charcot-Marie-Tooth, ou é causada por um agente tóxico, tal como um agente quimioterapêutico, álcool, um metal, uma toxina industrial, uma droga, uma vitamina, um contaminante de um alimento ou um contaminante de um medicamento.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 3, em que a neuropatia está associada a um agente quimioterapêutico seleccionado de entre vincristina, cisplatina, taxol ou didesoxiinosina.

5. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que um agente quimioterapêutico é utilizado simultaneamente numa preparação combinada.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o IGF-I ou IGF-III e o agente quimioterapêutico estão numa proporção entre 1:400 e 75:1 p/p.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que o agente quimioterapêutico é vincristina.

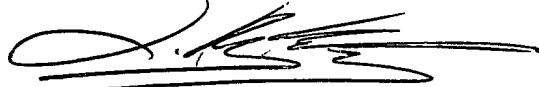
8. Utilização de acordo com a reivindicação 7, em que a proporção está entre 1:40 e 8:1 p/p.

9. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores,
em que o factor de crescimento semelhante a insulina é IGF-I.

Lisboa,

Por CEPHALON, INC. e ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF
MEDICINE OF YESHIVA UNIVERSITY

- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO



ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

EFEITO DE rhIGF-1 NA FUNÇÃO MOTORA
APÓS TRATAMENTO COM VINCRISTINA

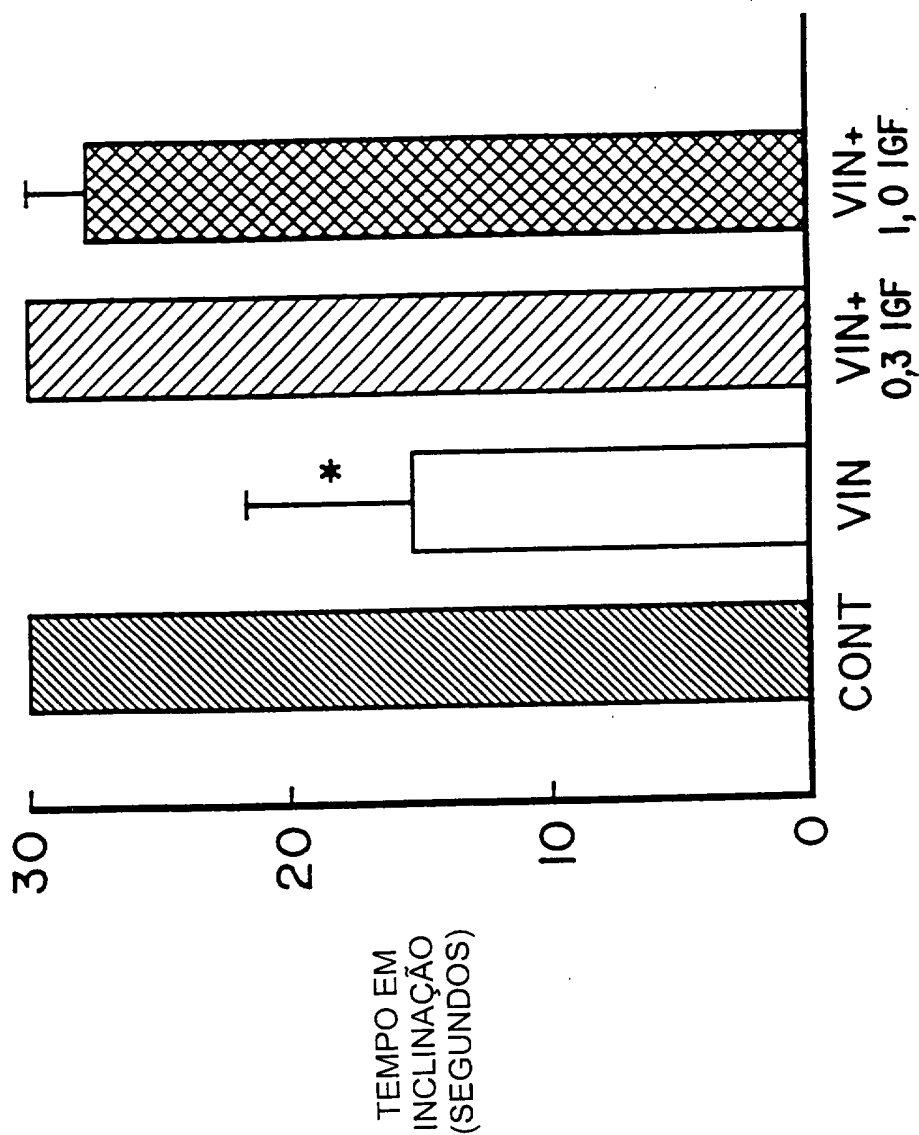


FIG. 1

[Handwritten signature]

EFEITO DE rhIGF-I NA FUNÇÃO DO NERVO TIBIAL APÓS TRATAMENTO COM VINCRISTINA

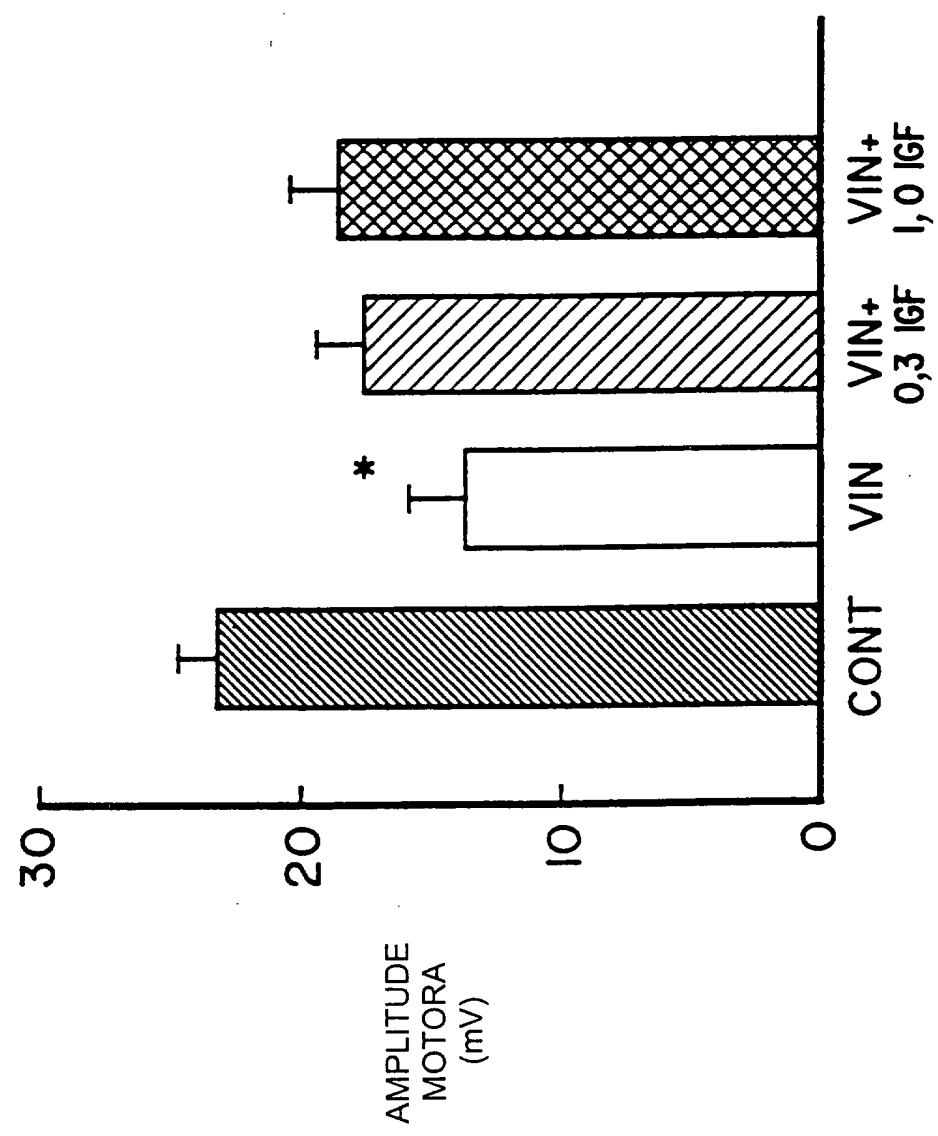


FIG. 2

EFEITO DE rhIGF-I NA FUNÇÃO DO NERVO CAUDAL APÓS TRATAMENTO COM VINCRISTINA

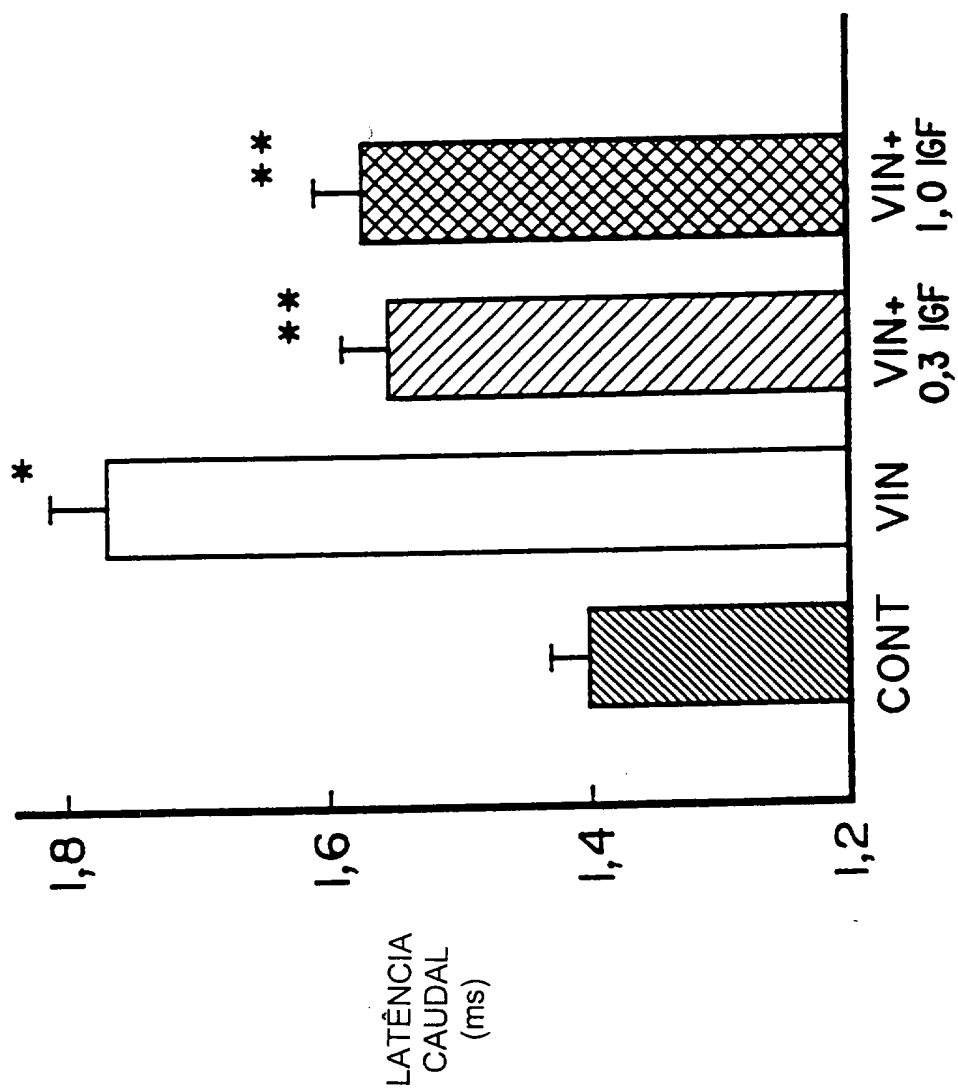


FIG. 3

[Handwritten signature]

4/5

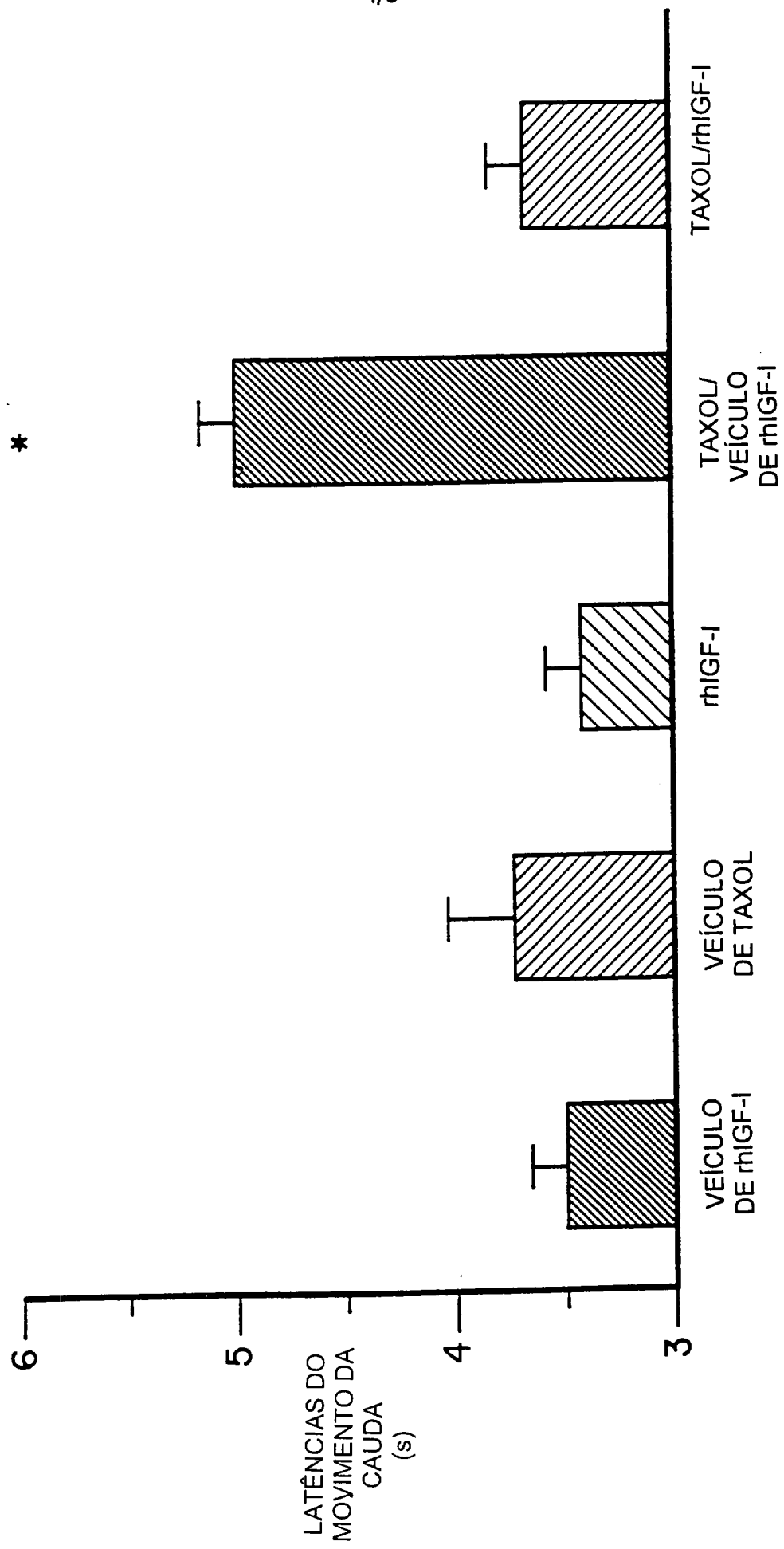


FIG. 4

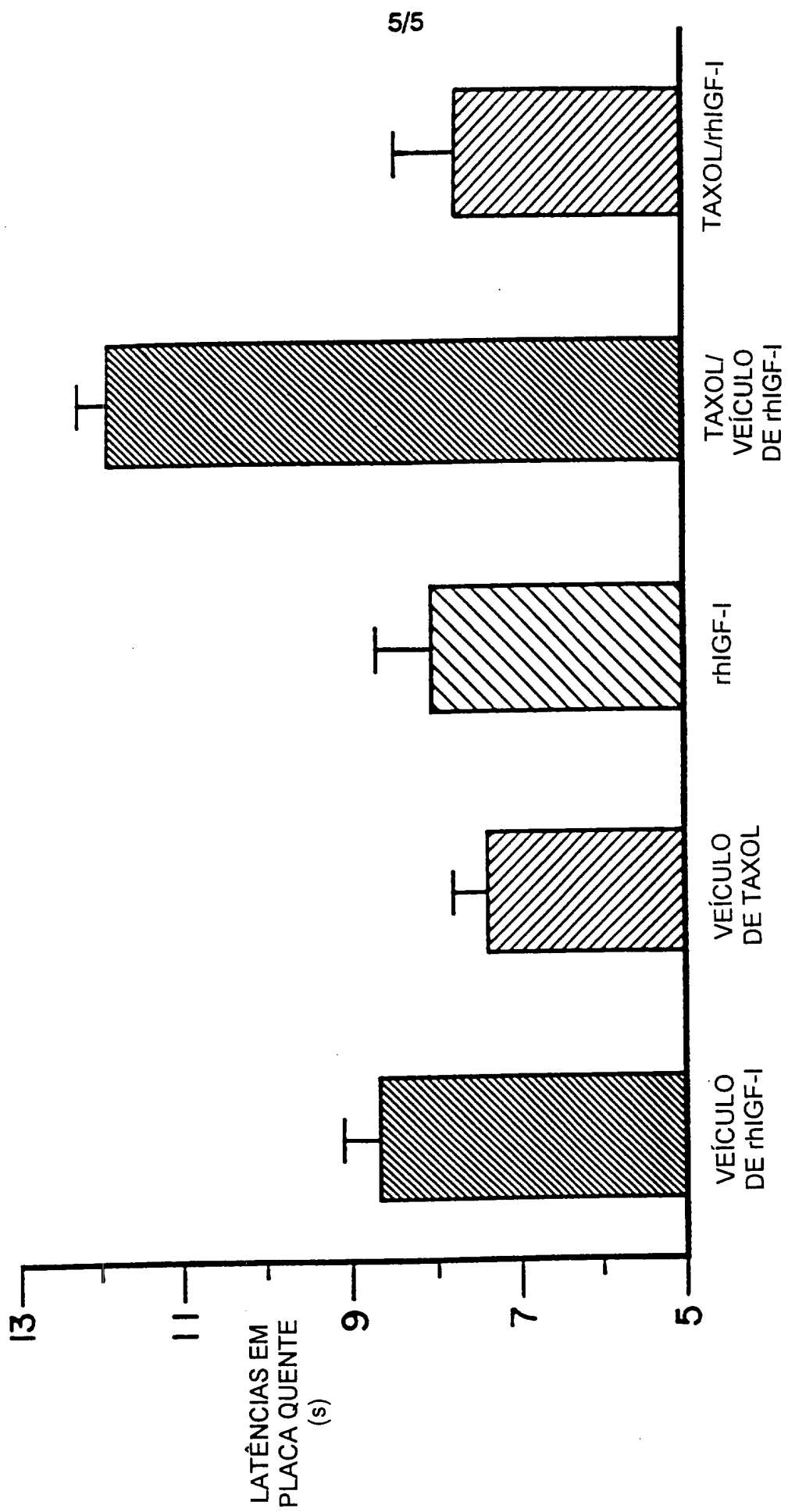


FIG. 5

[Handwritten signature]