

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º** 85 343


**REQUERENTE:** CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, japonesa,  
com sede em 5-1, 5-chome, Ukima, Kita-ku,  
Tokyo, Japão.

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COM-  
POSIÇÃO FARMACEUTICA ESTAVEL CONTENDO  
UM FACTOT ESTIMULANTE DE UMA COLÓNIA  
DE GRANULÓCITOS"

**INVENTORES:** Minoru Machida

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883.

Japão, em 18 de Julho de 1986, sob os Nos. 169486/1986,  
169487/1986, 169488/1986 e 169489/1986




Memória descritiva referente à patente de invenção de CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, japonesa, industrial e comercial, com sede em No. 5-1, 5-chome, Ukima, Kita-ku, Tokyo, Japão, (inventor: Minoru Machida, residente no Japão), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ESTÁVEL CONTENDO UM FACTOR ESTIMULANTE DE UMA COLÔNIA DE GRANULÓCITOS".

MEMÓRIA DESCRITIVA

A presente invenção refere-se a um processo de preparação de uma composição farmacêutica contendo um factor estimulante de uma colônia de granulócitos. Em particular, a presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica estabilizada contendo um factor estimulante de uma colônia de granulócitos que é protegida contra a perda ou desactivação do ingrediente activo (isto é, o factor estimulante da colônia de granulócitos) devida à adsorção na parede de um contentor no qual é colocada a composição, ou, a associação, polimerização ou oxidação do referido ingrediente.

A quimioterapia tem sido utilizada como um dos processos para tratar várias doenças infecciosas, mas verificou-se recentemente que a quimioterapia conduz a alguns problemas clínicos sérios como por exemplo a produção de organis




mos resistentes a medicamentos, alteração dos organismos causadores das doenças e a grandes efeitos laterais. Para evitar estes problemas associados com a quimioterapia envolvendo a utilização de agentes terapêuticos como por exemplo antibióticos e bactericidas, têm sido feitas tentativas para utilizar uma substância que active as capacidades profiláticas do hospedeiro de um organismo causador de infecção e dar assim origem a uma solução completa para os problemas acima mencionados da quimioterapia. Das várias capacidades profiláticas do hospedeiro, crê-se que a acção bactericida fagocítica dos leucócitos tem a influência maior no período inicial da infecção por bactérias e está portanto estabelecido como importante aumentar as capacidades protectoras de infecções do hospedeiro promovendo o crescimento de neutrófilos e a sua diferenciação no estado maduro. Um factor estimulante da colônia de granulócitos (G-CSF) é uma das substâncias muito úteis que apresentam essas acções e os mesmos signatários da presente invenção apresentaram anteriormente um pedido de patente de um agente protector de infecção utilizando G-CSF (Pedido de Patente Japonesa No. 23777/1985).

Tal como acima mencionado, a quimioterapia tal como correntemente praticada envolve vários problemas inevitáveis e têm sido feitos grandes esforços para utilizar um medicamento que seja capaz de activar as funções profiláticas do hospedeiro ou da pessoa que foi infectada.

É desnecessário dizer que o G-CSF apresenta ele próprio a capacidade de activar as funções profiláticas do hospedeiro e verificou-se também que o G-CSF exhibe efeitos terapêuticos superiores em aplicações clínicas se fôr utilizado em combinação com uma substância que active as capacidades profiláticas do hospedeiro.

Utiliza-se o G-CSF numa quantidade muito pequena e administra-se geralmente uma composição farmacêutica contendo 0,1-500 µg (preferivelmente 5 - 50 µg) de G-CSF a uma taxa de dosagem de 1 a 7 vezes por semana por adulto. Contudo, o G-CSF tem uma tendência para ser adsorvido na parede do seu contentor como por exemplo ampola para injeção ou seringa. Assim se se utilizar o medicamento como injeção na forma de uma solu-



ção aquosa, ele será adsorvido na parede do seu contentor como por exemplo ampola ou seringa. Este fenómeno resulta na falha do G-CSF para revelar totalmente a sua actividade como agente farmacêutico ou necessita da incorporação do G-CSF numa quantidade superior à necessária para compensar a sua possível perda por adsorção.

Em adição, o G-CSF é lábil e altamente susceptível a factores ambientais como por exemplo temperatura, humidade, oxigênio, e raios ultravioletas. Pela acção desses factores, o G-CSF sofre alterações físicas ou químicas como por exemplo associação, polimerização e oxidação e sofre uma grande redução da sua actividade. Estes fenómenos tornam difícil assegurar o completo estabelecimento de uma acção terapêutica por administração de uma quantidade muito pequena do G-CSF de modo muito preciso.

É assim necessário desenvolver uma composição farmacêutica estável de G-CSF que seja totalmente protegida contra uma queda na actividade do seu componente eficaz. Este é o principal objecto da presente invenção que apresenta uma composição farmacêutica estável de G-CSF.

Os presentes inventores conduziram estudos intensivos de modo a aumentar a estabilidade de uma composição farmacêutica contendo G-CSF e verificaram que este objecto pode ser eficazmente atingido por adição de um agente tensioactivo, sacárido, proteína ou composto de elevado peso molecular, farmacêuticamente aceitáveis.

Assim, a composição farmacêutica estável contendo G-CSF da presente invenção é caracterizada por conter G-CSF e pelo menos uma substância escolhida no grupo constituído por um agente tensioactivo, sacárido, proteína e composto de elevado peso molecular, farmacêuticamente aceitáveis.

O G-CSF a incorporar na composição farmacêutica da presente invenção pode ser obtido por quaisquer processos como por exemplo os descritos nas especificações dos Pedidos de Patente Japonesa Nos. 153273/1984, 269455/1985, 269456/1985, 270838/1985 e 270839/1985. Por exemplo, pode preparar-se o G-CSF humano cultivando uma estirpe celular (Número de

Acesso CNCM I-315 ou I-483) colhida de células de tumores de pacientes com cancro na cavidade oral, ou expressando um ADN recombinante (que tenha sido preparado por acção de um gene que codifique para um G-CSF humano) numa célula hospedeira adequada (por exemplo E.coli, célula C 127 ou células de ovário de uma hamster Chinesa).

Pode utilizar-se qualquer G-CSF anti-humano que tenha sido purificado em alto grau como G-CSF a incorporar na composição farmacêutica da presente invenção. De preferência os G-CSF humanos são os obtidos por isolamento do sobrenadante de uma cultura de uma célula produtora de G-CSF humano e de um polipéptido ou glicoproteína possuindo a mesma actividade do G-CSF que é obtido transformando um hospedeiro com um vector recombinante possuindo nele incorporado um gene que codifique para um polipéptido que possua a actividade do G-CSF humano.

Dois exemplos particularmente preferíveis de G-CSF humano são a seguir apresentados:

- (1) G-CSF humano possuindo as propriedades fisico-químicas
  - i) peso molecular: cerca de 19 000  $\pm$  1 000 medido por electroforese através de um gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida;
  - ii) ponto isoelétrico: possuindo pelo menos um dos três pontos isoelétricos,  $pI = 5,5 \pm 0,1$ ,  $pI = 5,8 \pm 0,1$ , e  $pI = 6,1 \pm 0,1$ ;
  - iii) adsorção por ultravioletas: possuindo uma adsorção máxima a 280 nm e uma adsorção mínima a 250 nm;
  - iv) sequência de aminoácidos de 21 resíduos da extremidade N:  
H<sub>2</sub>N-Thr-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-Leu-Pro-Gln-Ser-Phe-Leu-Leu-Lys-Cys-Leu-Glu-Gln-Val
- (2) G-CSF humano contendo ou um polipéptido com a actividade do factor estimulante do granulócito humano que é representado por toda ou parte da sequência de aminoácidos a seguir apresentada, ou uma glicoproteína possuindo quer o referido polipéptido quer uma parte da cadeia de açúcar:  
(Met)<sub>n</sub> Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe  
Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp

~~CONFIDENTIAL~~

Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu (Val Ser Glu)<sub>m</sub> Cys Ala Thr  
Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His  
Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser  
Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser  
Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly  
Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu  
Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu  
Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala  
Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly  
Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser  
Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

(com a condição de m ser 0 ou 1; e n ser 0 ou 1)


Para pormenores do processo para a preparação destes dois tipos de G-CSF, ver a especificação dos Pedidos de Patente Japonesa No.s 153273/1984, 269455/1985, 269456/1985, 270838/1985, e 270839/1985, tendo sido todos apresentados pelos signatários da presente invenção.

Outro processo que pode ser utilizado consiste em efectuar-se a fusão de uma célula produtora de G-CSF com uma célula de tumor maligno auto-poliferante e cultivar-se o hibridoma resultante na presença ou ausência de mitogénio.


A solução contendo G-CSF humano obtida pode ser armazenada no estado de congelada após ter sido purificada e concentrada, se necessário, por qualquer técnica conhecida. Alternativamente, pode armazenar-se a solução após ser desidratada por meios como liofilização.

Todos os G-CSF humanos assim preparados podem ser processados como especificado na presente invenção de modo a obterem-se preparações farmacêuticas contendo G-CSF estável.

Exemplos típicos do agente tensoactivo que é utilizado para preparar composições farmacêuticas contendo G-CSF estável da presente invenção são a seguir apresentados: agentes tensoactivos não-iónicos com HLB de 6-18 como por exemplo ésteres de sorbitano de ácido alifático (por exemplo monocaprilato de sorbitano, monolaurato de sorbitano e monopalmitato de sorbitano), ésteres de glicerina de ácidos alifáticos (por



exemplo monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina, e monoestearato de glicerina) ésteres de poliglicerina de ácido alifático (por exemplo monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo e monolinoleato de decaglicerilo) ésteres de polioxietileno/sorbitano de ácidos alifáticos (por exemplo monolaurato de polioxietileno sorbitano, monooleato de polioxietileno sorbitano, monoestearato de polioxietileno sorbitano, monopalmitato de polioxietileno sorbitano, trioleato de polioxietileno sorbitano e triestearato de polioxietileno sorbitano), ésteres de polioxietileno sorbitol de ácidos alifáticos (por exemplo tetraestearato de polioxietileno sorbitol e tetraoleato de polioxietileno sorbitol), ésteres de polietileno glicerina de ácidos alifáticos (por exemplo monoestearato de polioxietileno glicerilo), ésteres de polietilenoglicol de ácidos alifáticos (por exemplo diestearato de polietilenoglicol) éteres de polioxietileno alquilo (por exemplo éter de polioxietileno laurilo), éteres de polioxietileno polioxipropileno alquilo (por exemplo éter de polioxietileno polioxipropileno glicol, éter de polioxietileno polioxipropileno propilo, e éter de polioxietileno polioxipropileno cetilo) éteres de polioxietileno alquilfenilo (por exemplo éter de polioxietileno nonilfenilo, óleo de castor polioxietilado, óleo de castor endurecido polioxietilado (por exemplo óleo de castor hidrogenado polioxietilado), derivados de cera de abelhas polioxietilados (por exemplo cera de abelha polioxietilada com sorbitol), derivados de polioxietileno lanolina (por exemplo polioxietileno lanolina), e amidas de ácidos polioxietileno alifáticos (por exemplo amida do ácido polioxietileno esteárico; agentes tensioactivos não-iônicos como por exemplo sais do ácido alquil sulfúrico possuindo um grupo alquilo  $C_{10} - C_{18}$  (por exemplo cetil sulfato de sódio, lauril sulfato de sódio, e oleil sulfato de sódio), sais de éter de polioxietileno alquilo do ácido sulfúrico em que o número molar médio de adição de óxido de etileno é de 2 - 4 e o grupo alquilo tem 10 - 18 átomos de carbono (por exemplo polioxietileno lauril sulfato de sódio), sais dos ésteres de alquil sulfosuccinato em que o grupo alquilo tem 8 - 18 átomos de carbono (por exemplo éster de lauril sulfosuccinato de sódio) e agentes tensioactivos naturais como por exemplo



lecitina, glicerofosfolípido, esfingofosfolípido (por exemplo es-  
fingomielina), e ésteres de sacarose de ácido alifático em que o  
ácido alifático tem 12 - 18 átomos de carbono. Estes agentes ten-  
sioactivos podem ser obviamente utilizados independentemente ou  
em mistura.

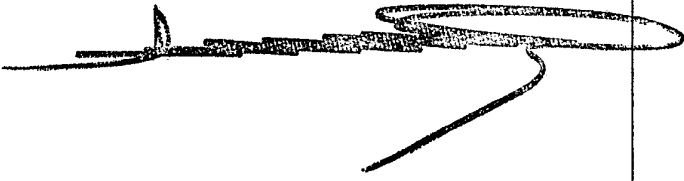
Os agentes tensioactivos apresenta-  
dos a seguir são usados preferivelmente em quantidades de 1 a  
10 000 partes em peso por parte em peso de G-CSF.

O sacárido a utilizar na preparação  
da composição farmacêutica contendo G-CSF estável da presente in-  
venção pode ser escolhido entre monossacáridos, oligossacáridos  
e polissacáridos, bem como ésteres de fosfato e dos seus deriva-  
dos nucleótidos desde que sejam farmacêuticamente aceitáveis. Os  
exemplos típicos são apresentados a seguir: álcoois trivalentes  
e de elevado açúcar como por exemplo glicerina, eritritol, arabi-  
tol, xilitol, sorbitol e manitol, açúcares ácidos como por exem-  
plo ácido glucurônico, ácido idurônico, ácido neuramínico, ácido  
galacturônico, ácido glucônico, ácido manurônico, ácido cetogli-  
cólico, ácido cetogalactônico e ácido cetogulônico, ácido hialu-  
rônico e os seus sais, sulfato de chondroitina e os seus sais,  
heparina, inulina, chitina e seus derivados, chitosano e seus de-  
rivados, dextrina, dextrano com pesos moleculares médios de 5 000  
a 150 000, e ácido alginíco e seus sais. Todos estes sacáridos  
podem ser utilizados com vantagem quer independentemente quer em  
mistura.

Os sacáridos acima referidos são  
usados preferivelmente em quantidades de 1 a 10 000 partes em pe-  
so por parte em peso de G-CSF.

Exemplos típicos de proteína a uti-  
lizar na preparação da composição farmacêutica contendo G-CSF es-  
tável da presente invenção incluem albumina do soro humano, glo-  
bulina de soro humano, gelatina, gelatina tratada com ácido (pe-  
so molecular médio 7 000 a 100 000), gelatina tratada com subs-  
tância alcalina (peso molecular médio 7 000 a 100 000) e colagé-  
nio. É desnecessário dizer que estas proteínas podem ser utiliza-  
das quer independentemente quer em mistura.

As proteínas acima apresentadas são




utilizadas preferivelmente em quantidades de 1-20 000 em peso por parte em peso de G-CSF.

Os exemplos típicos de compostos de elevado peso molecular a utilizar na preparação de composições farmacêuticas contendo G-CSF estável da presente invenção incluem: polímeros naturais como por exemplo hidroxipropilcelulose, hidroximetilcelulose, carboximetilcelulose de sódio e hidroximetilcelulose, e hidroxietilcelulose; e polímeros sintéticos tais como polietilenoglicol (peso molecular = 300-6 000), álcool polivinílico (peso molecular = 20 000-100 000), e polivinilpirrolidona (peso molecular = 20 000-100 000). É desnecessário dizer que se podem utilizar estes compostos de peso molecular elevado quer isoladamente quer em combinação.

Os compostos de elevado peso molecular acima referidos são utilizados desejavelmente em quantidades de 1-20 000 partes em peso por parte em peso de G-CSF.

Em adição ao agente tensioactivo, sacárido, proteína ou composto de elevado peso molecular acima descrito, pode também incorporar-se pelo menos um membro escolhido no grupo consistindo de um aminoácido, um agente redutor sulfuroso e um anti-oxidante, na preparação da composição farmacêutica contendo G-CSF da presente invenção. Os aminoácidos ilustrativos incluem glicina, treonina, triptofano, lisina, hidroxilisina, histidina, arginina, cisteína, cistina e metionina. Os agentes redutores sulfurosos ilustrativos incluem: N-acetilcisteína, N-acetilhomocisteína, ácido tiótico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico e os seus sais, tiosulfato de sódio, hidrogenossulfito de sódio, pirossulfito de sódio, sulfito de sódio, ácido tioláctico, ditiotreitól, glutatióna, e um agente redutor sulfuroso moderado possuindo um grupo sulfidilo como por exemplo um ácido tioalcanóico C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>. Os antioxidantes ilustrativos incluem ácido eritórbito, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisole, dl- $\alpha$ -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico e seus sais, palmitato do ácido L-ascórbico, estearato do ácido L-ascórbico, galato de triamilo, galato de propilo e agentes quelantes como exemplo etilenodiaminotetraacetato de sódio (EDTA), pirofosfato de sódio e metafosfato de sódio.




Os aminoácidos, agentes redutores sulfurosos e antioxidantes acima apresentados ou suas misturas são preferivelmente utilizados em quantidades de 1-10 000 partes em peso por parte em peso de G-CSF.

Com o objectivo de formular a composição contendo G-CSF estável da presente invenção numa forma de dosagem adequada, podem incorporar-se um ou mais dos seguintes agentes: um diluente, um auxiliar de solubilização, um agente isotônico, um excipiente, um modificador de pH um agente calmante e um tampão.

A composição farmacêutica de G-CSF estabilizado da presente invenção pode ser formulada quer para administração oral quer para administração parenteral como por exemplo injeção aplicada de várias maneiras, e podem utilizar-se várias formas de dosagem dependendo do modo específico de administração. As formas de dosagem típicas incluem: as que são indicadas para administração oral como por exemplo comprimidos, pílulas, cápsulas, grânulos e suspensões: soluções, suspensões e preparações liofilizadas com o objectivo principal de injeção intravenosa, injeção intramuscular, injeção subcutânea; e as que são indicadas para administração transmucosal como por exemplo supositórios rectais, medicamentos nasais e supositórios vaginais.

De acordo com a presente invenção adiciona-se pelo menos uma substância escolhida no grupo consistindo num agente tensioactivo, um sacárido, uma proteína ou um composto de elevado peso molecular à composição farmacêutica contendo G-CSF de modo a evitar que esta seja adsorvida na parede do seu contentor ou numa seringa enquanto simultaneamente ela permanece estável durante um longo período de tempo.

O mecanismo detalhado através do qual as substâncias acima mencionadas estabilizam o G-CSF ou evitam de ser adsorvido necessita ainda de ser esclarecido. Na presença de um agente tensioactivo, a superfície de G-CSF é uma proteína hidrofóbica deve ser recoberta com o agente tensioactivo para se tornar solubilizada de modo a que se evite que o G-CSF presente numa quantidade traço seja efectivamente adsorvido na




parede do seu contentor ou seringa. Um sacárido ou um composto hidrofílico de elevado peso molecular formará uma camada hidratada entre o G-CSF e a superfície adsorvente da parede do seu contentor ou seringa evitando assim a adsorção do G-CSF de modo eficaz. Uma proteína competirá com o G-CSF para adsorção na parede do seu contentor ou seringa, inibindo assim eficazmente a adsorção de G-CSF.

Para além da prevenção da adsorção de G-CSF, as substâncias acima mencionadas também contribuirão para evitar a associação ou polimerização das moléculas de G-CSF. Na presença de um agente tensioactivo, sacárido, proteína ou composto de elevado peso molecular, as moléculas individuais de G-CSF serão dispersas nessas substâncias e a interacção entre as moléculas de G-CSF é suficientemente reduzida para provocar uma diminuição significativa na probabilidade da sua associação ou polimerização. Em adição, estas substâncias retardarão a oxidação de G-CSF que é acelerada a alta temperatura ou humidade ou evitarão a associação ou polimerização do G-CSF como resultado da sua auto-oxidação. Estes efeitos de retardar a auto-oxidação de G-CSF ou de evitar a sua associação ou polimerização serão ainda aumentados por adição de um aminoácido, de um agente redutor sulfuroso ou de um antioxidante.

Os problemas acima descritos são particularmente notáveis em soluções para injeções e em suspensões mas também ocorrem durante o processo da formulação de G-CSF em outras formas de dosagem como por exemplo comprimidos. A adição de agentes tensioactivos, sacáridos, proteínas ou compostos de elevado peso molecular é também eficaz neste último caso.

Através da adição de pelo menos uma substância escolhida no grupo consistindo num agente tensioactivo, sacárido, proteína e composto de elevado peso molecular, G-CSF é altamente estabilizado e mantém a sua actividade durante um período prolongado de tempo, como será demonstrado nos exemplos que se seguem. Para conseguir estes resultados, a quantidade de cada uma destas substâncias, em particular o seu limite inferior, é crítico e são desejáveis as seguintes gamas: 1-10 000 partes em peso de agente tensioactivo, 1-10 000 partes em peso de



sacárido, 1-20 000 partes em peso de proteína, e 1-20 000 partes em peso de um composto de elevado peso molecular, por cada parte em peso de G-CSF.

De acordo com a presente invenção, utiliza-se um agente tensioactivo, um sacárido, um proteína e/ou um composto de elevado peso molecular numa concentração especificada e isto é eficaz não apenas em evitar a adsorção do G-CSF na parede do seu contentor ou seringa mas também no aumento da estabilidade da composição farmacêutica contendo G-CSF. Como resultado, torna-se possível assegurar a administração de uma pequena mas muito precisa dose de G-CSF a pacientes; dado que o G-CSF é caro, a sua utilização eficaz conduzirá a custos inferiores para a produção de composições farmacêuticas contendo G-CSF.

Os seguintes exemplos são apresentados com o objectivo de ilustrarem adicionalmente a presente invenção mas não devem ser tidos como limitativos. Nestes exemplos, determinou-se a actividade residual de G-CSF por um dos seguintes processos.

(a) Processo de ágar macio utilizando células da espinal medula do rato:

Misturaram-se soro de cavalo (0,4 ml), 0,1 ml da amostra, 0,1 ml de uma suspensão de células da espinal medula do rato C3H/He (fêmea) ( $0,5 - 1 \times 10^5$  células nucleares) e 0,4 ml de uma solução de cultura modificada de McCoy 5A contendo 0,75% de ágar, deitou-se num prato de plástico para cultura de tecidos  $\varnothing$  35 mm), coagulou-se, e fez-se a cultura durante 5 dias a 37° C numa mistura de 5% CO<sub>2</sub>/95% de ar e com 100% de humidade. Contou-se o número de colónias formadas (consistindo uma colónia em pelo menos 50 células) e determinou-se a actividade sendo uma unidade a actividade para formar uma colónia.

Preparou-se a solução de cultura modificada de McCoy 5A utilizada no processo (a) pelos seguintes procedimentos.

Solução de cultura modificada de McCoy (dupla concentração)

Dissolveram-se duas vezes em 500 ml de água destilada 12 g de solução de cultura de McCoy SA (Gibco), 2,55 g de um meio de aminoácido MEM-vitamina (Nissui Seiyaku Co.,

Ltd.), 2,18 g de bicarbonato de sódio e 50 000 unidades de penicilina G de potássio e filtrou-se assepticamente a solução através de um filtro Millipore (0,22 µm).

(b) Cromatografia líquida de alto rendimento de fase inversa:

Determinou-se, utilizando uma coluna de fase inversa C8 (4,6 mm x 300 mm; 5 µm) e uma mistura de n-propanol/ácido trifluoroacético como fase móvel, a actividade residual de G-CSF (injectado numa quantidade equivalente a 1 µg) com as seguintes condições de gradiente:

<u>Tempo (seg)</u>	<u>Solvente A</u>	<u>Solvente B</u>	<u>Gradiente</u>
0	100%	0%	linear
15	0%	100%	linear
25	100%	0%	linear

Solvente (A): 30% n-propanol e 0,1% de ácido trifluoroacético

Solvente (B): 60% n-propanol e 0,1% de ácido trifluoroacético

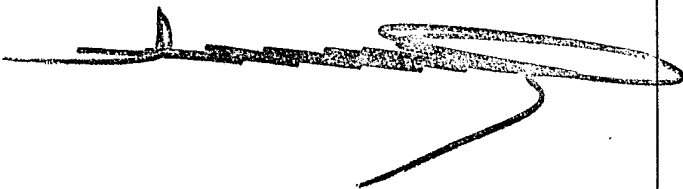
Conduziu-se a detecção a um comprimento de onda de 210 nm e calculou-se a percentagem de actividade residual de G-CSF pela seguinte fórmula:

$$\text{Actividade residual de G-CSF (\%)} = \frac{\text{quantidade residual de G-CSF após algum tempo}}{\text{quantidade inicial de G-CSF}} \times 100$$

A quantidade de G-CSF determinada por este processo correlacionava-se muito bem com o resultado obtido na medida pelo processo de ágar macio (a) utilizando células da medula espinal do rato.

EXEMPLO 1

Adicionaram-se a 5 µg de G-CSF um dos agentes estabilizantes referidos na Tabela 1 e dissolveu-se assepticamente a mistura numa solução tampão 20 mM (contendo 100 mM de cloreto de sódio; pH 7,4) para se obter uma composição farmacêutica contendo 5 µg de G-CSF por ml, que foi em seguida lio-



filizada. Mediu-se a alteração dependente do tempo da actividade de G-CSF pelo processo (a) e os resultados obtidos são apresentados na Tabela I. O termo "actividade (%)" na tabela representa a actividade residual de G-CSF em relação à unidade inicial e é definida pela seguinte fórmula:

$$\text{Actividade (\%)} = \frac{\text{unidade de actividade após algum tempo}}{\text{unidade de actividade inicial}} \times 100$$

Fez-se a liofilização pelos seguintes procedimentos:

Colocou-se a solução de G-CSF contendo um agente estabilizante num frasco de vidro esterilizado sulfatado, arrefeceu-se a  $-40^{\circ}\text{C}$  ou inferior durante 4 horas ou inferior, submeteu-se a uma secagem primária aquecendo entre  $-40^{\circ}\text{C}$  e  $0^{\circ}\text{C}$  durante um período de 48 horas sendo a pressão aumentada de 0,03 a 0,1 torr, e em seguida a secagem secundária por aquecimento de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $20^{\circ}\text{C}$  durante um período de 12 horas com a pressão aumentando de 0,03 a 0,08 torr; em seguida encheu-se o interior do frasco com azoto gasoso esterilizado para atingir uma pressão atmosférica e fechou-se o frasco com uma rolha de borracha liofilizante, em seguida selou-se com uma tampa de alumínio.

Tabela 1

Agente estabilizante	Quantidade (partes em peso)	Actividade (%)	
		Após armaze- nagem a 4°C durante 6 meses	Após armaze- nagem a 37°C durante 1 mês
xilitol	10 000	92	86
manitol	10 000	91	85
ácido glucurônico	10 000	86	82
ácido hialurônico	2 000	92	89
dextrano (p.m. 40 000)	2 000	95	90
heparina	5 000	85	80
chitosano	2 000	93	91
ácido algínico	2 000	90	90
albumina de soro humano	1 000	98	99
globulina de soro humano	1 000	98	95
gelatina tratada com ácido	2 000	97	95
gelatina tratada com subs- tância alcalina	1 000	99	96
colagênio	2 000	95	90
polietilenoglicol (p.m. 4 000)	10 000	94	90
hidroxipropil celulose	1 000	98	94
carboximetil celulose de sódio	1 000	88	80
hidroximetilcelulose	5 000	92	90

Tabela 1 (cont.)

Agente estabilizante	Quantidade (partes em peso)	Actividade (%)	
		Após arma- zenagem a 4°C duran te 6 meses	Após armaze nagem a 37°C durante 1 mês
álcool polivinílico (p.m. 50 000)	2 000	96	95
polivinilpirrolidona (p.m. 50 000)	2 000	95	94
albumina de soro humano manitol cisteína	2 000 2 000 100	100	97
albumina de soro humano monolaurato de polioxi- etileno sorbitano manitol	2 000 100 2 000	99	96
albumina de soro humano hidroxipropilcelulose dextranso (p.m. 40 000)	2 000 500 2 000	98	92
monolaurato de polioxi- etileno sorbitano sorbitol	100 2 000	98	96
óleo de castor endurecido polioxietido dextranso (p.m. 40 000)	100 2 000	94	92
não adicionado	-	74	58

EXEMPLO 2

Adicionou-se a 10 ug de G-CSF um dos agentes estabilizantes referidos na Tabela 2 e dissolveu-se assepticamente a mistura numa solução tampão de fosfato 20 mM (contendo 100 mM de cloreto de sódio; pH 7,4) para se obter uma composição farmacêutica contendo 10 ug de G-CSF por ml. Carregou-se assepticamente a composição num frasco de vidro sulfatado e selou-se para se obter uma solução de G-CSF. Mediu-se a alteração dependente do tempo da actividade de G-CSF nesta solução pelo mesmo processo utilizado no Exemplo 1 e apresentam-se os resultados obtidos na Tabela 2.

Tabela 2

Agente estabilizante	Quantidade (parte em peso)	Actividade (%)		
		Após armazenagem a 4°C durante 7 dias	Após armazenagem a 4°C durante 2 meses	Após armazenagem a TA durante 1 mês
manitol	5 000	91	87	82
ácido hialurônico	2 000	93	87	70
dextrano (p.m. 40 000)	2 000	96	95	85
glicerina	10 000	90	90	88
ácido neuramínico	5 000	93	91	84
chitina	2 000	95	92	86
dextrina	2 000	90	92	87
albumina de soro humano	1 000	99	95	92
globulina de soro humano	1 000	98	94	90
gelatina tratada com ácido	2 000	97	96	87
gelatina tratada com substância alcalina	500	99	95	92

Tabela 2 (cont.)

Agente estabilizante	Quantidade (parte em peso)	Actividade (%)		
		Após armazenagem a 4°C durante 7 dias	Após armazenagem a 4°C durante 2 meses	Após armazenagem a TA durante 1 mês
colagênio	2 000	99	94	88
polietilenoglicol (p.m. 4 000)	10 000	94	89	90
hidroxipropilcelulose	2 000	98	95	92
carboximetil celulose de sódio	2 000	92	91	80
hidroxietilcelulose	4 000	92	94	90
álcool polivinílico (p.m. 50 000)	4 000	97	93	90
polivinilpirrolidona (p.m. 50 000)	4 000	95	95	92
monolaurato de sorbitano	400	97	96	95
polioxietileno monolaurato de sorbitano	400	100	96	94
polioxietileno monoestearato de sorbitano	400	98	97	94
éter de polioxietileno polioxipropileno glicol	400	100	94	93
óleo de castor endurecido polioxetilado	400	99	98	90
lauril sulfato de sódio	2 000	97	93	87
lecitina	2 000	97	94	90
soro de albumina humana	2 000			
manitol	2 000	100	99	97
cisteína	100			

Tabela 2 (cont.)

Agente estabilizante	Quantidade (parte em peso)	Actividade (%)		
		Após armazenagem a 4°C durante 7 dias	Após armazenagem a 4°C durante 2 meses	Após armazenagem a TA durante 1 mês
albumina de soro humano	2 000			
monolaurato de polioxietileno	100	99	97	95
manitol	2 000			
albumina de soro humano	1 000			
hidroxipropil celulo se	500	99	97	95
dextrano (p.m.40 000)	2 000			
monopalmitato polioxietileno sorbitano	100	96	96	93
sorbitol	2 000			
óleo de castor endurecido polioxietilado	100	95	92	92
dextrano (p.m.40 000)	2 000			
não adicionado	-	72	61	47

EXEMPLO 3

Adicionou-se a 10 ug de G-CSF, um dos agentes estabilizantes apresentados na Tabela 3 e dissolveu-se a mistura assepticamente numa solução tampão de fosfato 20 mM (contendo 100 mM de cloreto de sódio; pH 7,4) para se obter uma composição farmacêutica contendo 10 ug de G-CSF por ml. Carregou-se 1 mililitro da preparação num frasco de vidro revestido com silicone e sulfa-tratado e deixou-se a 4°C. Avaliou-se a eficiência de cada agente estabilizante em evitar a adsorção de G-CSF medindo a actividade residual de G-CSF na solução passadas

0,5, 2 e 24 horas. Efectuou-se a medida pelo processo (b) utilizando cromatografia líquida de alto rendimento de fase inversa. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3

Agente estabilizante	Quantidade (parte em peso)	Actividade residual (%)			
		inicial	0.5 h	2 h	24 h
manitol	5 000	100	93	90	91
ácido hialurônico	2 000	100	97	92	92
dextrano (p.m. 40 000)	2 000	100	98	95	96
glicerina	10 000	100	94	91	90
heparina	2 000	100	92	90	90
ácido glucurônico	5 000	100	96	90	91
ácido cetoglicólico	5 000	100	92	88	90
albumina de soro humano	1 000	100	100	101	99
globulina de soro humano	1 000	100	98	100	98
gelatina tratada com substância alcalina	500	100	99	98	99
gelatina tratada com ácido	2 000	100	99	97	97
colagênio	2 000	100	100	98	99
polietilenoglicol (p.m. 4 000)	10 000	100	100	100	99

Tabela 3 (cont.)

Agente estabilizante	Quantidade (parte em peso)	Actividade residual (%)			
		inicial	0.5 h	2 h	24 h
hidroxipropilcelulose	2 000	100	100	100	99
carboximetil celulose de sódio	2 000	100	98	96	95
hidroxietilcelulose	4 000	100	96	93	92
polivinílico álcool (p.m.50 000)	4 000	100	99	100	98
polivinilpirrolidona (p.m.50 000)	4 000	100	98	98	96
monocaprilato de sorbitano	400	100	100	100	98
monoestearato de polioxietileno	400	100	100	98	100
óleo de castor polioxetilado	400	100	99	101	99
lauril sulfato de sódio	2 000	100	100	99	97
lecitina	2 000	100	99	100	98
albumina de soro humano	2 000				
manitol	2 000	100	100	100	101
cisteína	100				
albumina de soro humano	2 000				
polioxietileno mono laurato de sorbitano	100	100	100	98	99
manitol	2 000				
albumina de soro humano	1 000				
hidroxipropil celulose	500	100	101	99	100
dextrano (p.m.40 000)	2 000				

Tabela 3 (cont.)

Agente estabilizante	Quantidade (parte em peso)	Actividade residual (%)			
		inicial	0.5 h	2 h	24 h
monolaurato de polioxietileno sorbitano	100	100	100	99	99
sorbitol	2 000				
óleo de castor endurecido polioxitilado	100	100	100	98	97
dextrano (p.m. 40 000)	2 000				
não adicionado	-	100	91	72	73



## REIVINDICAÇÕES

- 1<sup>a</sup> -


Processo para a preparação de uma composição farmacêutica contendo um factor estimulante de uma colônia de granulócitos estável, caracterizado por se incorporar, em adição ao factor estimulante de uma colônia de granulócitos, presente como ingrediente activo numa quantidade de 0,1-500 µg, preferivelmente 5-50 µg, pelo menos uma substância escolhida do grupo consistindo num agente tensioactivo, sacárido, proteína e composto de elevado peso molecular, farmacêuticamente aceitáveis.

- 2<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o agente tensioactivo se incorporar numa quantidade de 1 - 10 000 partes em peso por parte em peso do factor estimulante de uma colônia de granulócitos.

- 3<sup>a</sup> -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2 caracterizado por o referido agente tensioactivo ser pelo menos um membro escolhido do grupo consistindo num agente tensioactivo não-iônico, um agente tensioactivo aniônico e um agente tensioactivo natural, sendo o agente tensioactivo não-iônico um éster de sorbitano de ácido alifático, um éster de glicerina de ácido alifático, um éster de poliglicerina de ácido alifático, um éster de polioxietileno sorbitano de ácido alifático, um éster de polioxietileno sorbitol de ácido alifático, um éster




de polioxietileno glicerina de um ácido alifático, um éster de polietilenoglicol de ácido alifático, um éter de polioxietileno alquilo, um éter de polioxietileno polioxipropileno alquilo, um éter de polioxietileno alquilfenilo, um óleo de castor endurecido polioxietilado, um derivado de cera de abelhas polioxietilado, um derivado de polioxietileno lanolina, ou uma amida de polioxietileno de ácido alifático, sendo o agente tensioactivo aniônico um sal de alquil sulfato, um sal de sulfato de éter de polioxietilenoalquilo, ou um sal do éster alquil-sulfosuccinato, e sendo o agente tensioactivo natural lecitina, glicerofosfolípido, esfingofosfolípido, ou um éster de sacarose de ácido alifático.

- 4<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se incorporar um sacárido numa quantidade de 1 - 10 000 partes em peso por parte em peso do factor estimulante de uma colônia de granulócitos.

- 5<sup>a</sup> -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 4 caracterizado por o referido sacárido ser pelo menos um membro escolhido no grupo consistindo em glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol, manitol, ácido glucurônico, ácido idurônico, ácido galacturônico, ácido neuramínico, ácido glicônico, ácido manurônico, ácido cetoglicólico, ácido cetogalactônico, ácido cetogulônico, ácido hialurônico e dos seus sais, sulfato de chondroitina e seus sais, heparina, inulina, chitina e seus derivados, chitosano e seus derivados, dextrina, dextrano com peso molecular médio de 5 000 - 150 000, e ácido algínico e seus sais.



- 6<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se incorporar a proteína numa quantidade de 1 - 20 000 partes em peso por parte em peso do factor estimulante de colônia de granulócitos.

- 7<sup>a</sup> -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 6 caracterizado por a referida proteína ser pelo menos um membro escolhido no grupo consistindo em albumina do soro humano, globulina de soro humano, gelatina, gelatina tratada com ácido ou substância alcalina com um peso molecular médio de 7 000 - 100 000, e colagénio.

- 8<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por se incorporar o composto de elevado peso molecular numa quantidade de 1 - 20 000 partes em peso por parte em peso do factor estimulante de uma colônia de granulócitos.

- 9<sup>a</sup> -

Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 8 caracterizado por o referido composto de elevado peso molecular ser pelo menos um membro escolhido no grupo consistindo em hidroxipropilcelulose, hidroximetilcelulose, carboximetil celulose, de sódio hidroxietilcelulose, polietilenoglicol

com peso molecular de 300 - 6 000, álcool polivinílico com um peso molecular 20 000 - 100 000 e polivinilpirrolidona com um peso molecular de 20 000 -100 000.

A requerente declara que os primeiros pedidos desta patente foram apresentados no Japão em 18 de Julho de 1986, sob os n.os 169486/1986, 169487/1986, 169488/1986 e 169489/1986.

Lisboa, 16 de Julho de 1987

A handwritten signature in black ink, consisting of several horizontal strokes and a vertical line extending downwards from the right side.



RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ESTÁVEL CONTENDO UM FACTOR ESTIMULANTE DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um composição farmacêutica contendo um factor estimulante de uma colônia de granulócitos estável, que compreende incorporar-se, em adição ao factor estimulante de uma colônia de granulócitos presente como ingrediente activo, pelo menos uma substância escolhida do grupo consistindo num agente tensoactivo, sacárido, proteína e composto de elevado peso molecular, farmacêuticamente aceitáveis.