

(11) Número de Publicação: **PT 1069912 E**

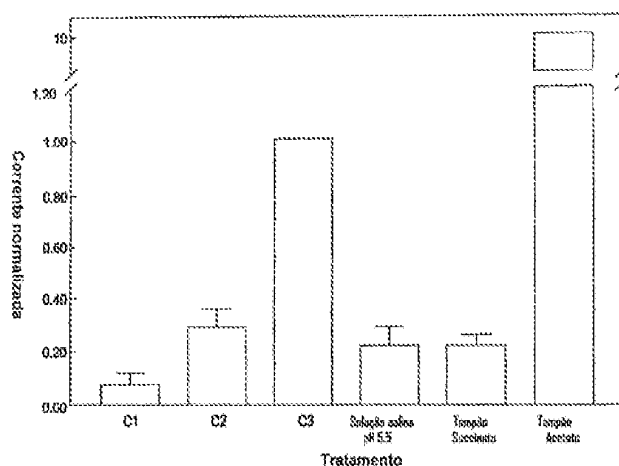
(51) Classificação Internacional:
A61K 47/12 (2006.01) **A61K 38/30** (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1999.04.02	(73) Titular(es): NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC. 4560 HORTON STREET EMERYVILLE, CA 94608 US
(30) Prioridade(s): 1998.04.03 US 80008 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2001.01.24	
(45) Data e BPI da concessão: 2007.07.25 080/2007	(72) Inventor(es): BRET A. SHIRLEY US MANINDER S. HORA US
	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÕES INJECTÁVEIS DE IGF CONTENDO SUCCINATO COMO AGENTE TAMPÃO**

(57) Resumo:
FORMULAÇÕES INJECTÁVEIS DE IGF CONTENDO SUCCINATO COMO AGENTE TAMPÃO

RESUMO**"Formulações injectáveis de IGF contendo succinato como agente tampão"**

O invento refere-se a formulações de um agente farmacologicamente activo para utilização *in vivo*. As formulações para as quais o invento se encontra direccionado destinam-se a minimizar a dor associada aos componentes em formulações injectáveis, além do agente farmacologicamente activo. O invento é particularmente direccionado para tampões que proporcionam o mínimo de dor após injeção. O factor de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) é um agente farmacologicamente activo preferido.

DESCRIÇÃO

"Formulações injectáveis de IGF contendo succinato como agente tampão"

Campo do invento

O campo do invento são formulações injectáveis de agentes farmacêuticamente activos para utilização *in vivo*. As formulações para as quais o invento se encontra direccionado destinam-se a minimizar a dor associada com componentes em formulações injectáveis, que não os componentes activos. O invento é particularmente direccionado para formulações farmacêuticas que são tamponadas com succinato e que proporcionam redução de dor após a injeção. O factor de crescimento humano semelhante à insulina (hIGF-I) é o agente farmacêuticamente activo.

Antecedentes do invento

Numerosos estudos demonstraram que a injeção subcutânea pode ser dolorosa (Ipp et al. (1990) *Pediatrics* 85:134-135); Zindel (1989) *Conn. Med.* 53:741-744); Gazzaniga et al. (1993) *Int. Surg.* 78:271-275). Existe pouca informação acerca das causas da dor na injeção devido às variáveis na formulação. Foi postulado que os factores que provocam dor incluem o volume de injeção, velocidade de injeção, osmolalidade, pH, local de injeção, dimensão e qualidade da agulha de injeção, presença de substâncias irritantes e temperatura da solução (Fransson et al. (1996) *J. Pharm. Pharmacol.* 48:1012-1015).

A maior parte das formulações farmacêuticas injectáveis contém um tampão de forma a estabilizar o agente farmacêuticamente activo contra a degradação química que poderia ocorrer se o pH se modificar de modo apreciável. Os sistemas de tampão mais vulgarmente utilizados em formulações farmacêuticas injectáveis são os citratos, acetatos e fosfatos. Contudo, a injeção de tais formulações tem sido associado com dor. Por exemplo, foi reportado que a injeção de uma solução salina é menos dolorosa do que uma injeção de tampão citrato (Fleischaker et al. (1993) *J. Clin. Pharmacol.*

33:182-190).

Frenken et al. (1993) *Am. J. Kidney Dis.* 22:553-556, descreveram um estudo clínico no qual foi avaliado o papel de citrato 20 mM em provocar dor após administração subcutânea de Epoetina α . Os resultados sugeriram que citrato de sódio 20 mM (pH 6,9) provoca dor significativa quando comparado com solução salina. Os resultados de outro estudo pelo mesmo grupo sugeriram que (1) era benéfica a injeção de menores volumes; (2) o ajuste da osmolaridade de Eprex para levá-la à isotonicidade não reduzia a dor; e (3) a inclusão de álcool benzílico na injeção diluída diminuía a dor, presumivelmente devido aos efeitos anestésicos (Frenken et al. (1994) *Nephrol. Dial. Transplant.* 9:1295-1298).

A injeção de IGF-I tem sido associada com dor. A literatura ensina que os tampões preferidos nas formulações de IGF-I são os tampões acetato, fosfato e citrato. Por exemplo, a patente U.S. 5374620 menciona a possível utilização de um tampão succinato em formulações farmacêuticas contendo IGF-I e GH. Contudo, a patente '620 ensina que o acetato de sódio, opcionalmente em combinação com citrato de sódio, é o tampão preferido.

Fransson et al. (1996) (*J. Pharm. Pharmacol.* 48:1012-1015) estudaram formulações para minimizar a dor com a injeção subcutânea de hIGF-I. O estudo avaliou como o pH, concentração do tampão, e presença de hIGF-I afectam a tolerância local à injeção subcutânea da solução. O estudo reportou que (1) um tampão com elevada capacidade tamponizante (fosfato 50 mM) a pH 6,0 tornado isotónico com NaCl provocava de modo significativo mais dor do que uma formulação com tampão fosfato 10 mM; (2) formulações de hIGF tamponadas com fosfato a pH 7 eram bem toleradas; (3) formulações de hIGF-I com fosfato 10 mM, com controlo de pH, eram tão bem toleradas quanto a formulação a pH 7; e (4) O hIGF-I em si não provocava dor.

O pedido de patente WO 94/15584 é direccionado para formulações injectáveis para administração subcutânea de IGF-I concebidas para reduzir a dor. A referência ensina a utilização de um tampão fosfato para reduzir a dor da

injecção subcutânea.

Em EP-A-0284249 divulga-se uma composição de linfoquina liofilizada compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma linfoquina tal como um interferão e, de entre outros componentes, um tampão tal como uma combinação de ácido succínico e succinato de sódio. Em US-5151265 divulga-se uma composição líquida farmacêutica compreendendo interferão gama não liofilizável. A composição inclui um tampão, o qual pode ser citrato, succinato, tartarato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato ou acetato e mantém a composição a um pH de 4,0 a 6,0. Em WO 96/40894 divulgam-se composições para o tratamento da resistência à insulina através da inibição da fosforilação em serina da proteína quinase C. Tais composições podem incluir um tampão succinato. Em U.S. 5681814 divulgam-se formulações de IGF1 compreendendo estabilizador osmólito, uma solução tamponada e opcionalmente um tensioactivo. Exemplos de tampão incluem succinato.

Em WO 95/31213 divulgam-se formulações líquidas de interferão beta estabilizadas com um poliol, um açúcar não redutor ou um aminoácido. São igualmente divulgadas composições compreendendo succinato. Em JP 09/304379 divulgam-se métodos profiláticos para redução do risco de trombose os quais usam a administração de TPFI (inibidor da via tecidular) para alcançar níveis mais elevados no plasma. O TPFI pode ser formulado de acordo com quaisquer meios conhecidos na arte, incluindo formulações incluindo tampões.

Os sujeitos injectados com formulações de IGF-I tamponadas por fosfato ou acetato apresentam menos dor do que com uma formulação com citrato. No entanto, um nível significativo de dor permanece associada com a injecção de formulações de IGF-I tamponadas por fosfato ou acetato. Em conformidade, um objecto do invento é o de proporcionar composições farmacêuticas aperfeiçoadas que resultem em diminuição de dor após injecção.

Um objecto específico do invento é o de proporcionar uma composição farmacêutica que permite a injecção de hIGF-I com diminuição de dor.

Um outro objecto específico do invento é o de proporcionar uma composição farmacêutica na qual o agente farmacêuticamente activo seja estável e deste modo possa ser armazenada durante períodos de tempo prolongados sem qualquer decomposição física e/ou biológica.

Sumário do invento

O presente invento é baseado na constatação pelos inventores de que as formulações farmacêuticas tamponadas com succinato provocam menos dor na injeção do que as formulações contendo tampões mais vulgarmente utilizados, tais como os tampões fosfato, acetato e citrato. Em particular, os inventores determinaram que os tampões succinato diminuem a dor associada com a injeção de formulações de IGF-I. Com base nesta constatação, é agora possível desenvolver composições farmacêuticas para IGF-I e outros agentes farmacêuticamente activos com diminuição da dor devida à injeção. Antigamente, a literatura médica não sugeria a utilização de tampão succinato para minimizar a dor associada com injeção.

O presente invento proporciona uma composição farmacêutica injectável compreendendo factor de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-I) ou uma variante biologicamente activa do mesmo e um tampão, em que o referido tampão consiste substancialmente em succinato numa concentração de 10 mM a 40 mM e um contra-íão, e em que a referida variante é um polipéptido possuindo actividade IGF-I e pelo menos 70% em identidade de sequência de aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos da IGF-I humana.

A utilização de succinato como tampão proporciona diminuição de dor após injeção. Numa concretização preferida, a composição do invento compreende IGF-I e succinato de sódio.

As composições farmacêuticas do invento podem ser armazenadas durante períodos de tempo prolongados mantendo a integridade física e biológica do agente farmacêuticamente activo. O invento é igualmente direccionado para a administração de qualquer uma das composições farmacêuticas

anteriormente e aqui descritas.

Breve descrição das Figuras

Figura 1. Estabilidade de rhIGF-I em função do pH. Neste estudo, foi formulado com rhIGF, tampão citrato-fosfato numa gama de pH de 4,0-7,0. A integridade percentual do pico principal (o pico que contém a molécula pura) foi medida durante um período de oito semanas a uma temperatura de 50°C. A medição foi através de CN(ciano)-RP-HPLC.

Figura 2. Estabilidade de rhIGF-I em função do pH. Neste estudo, foi formulado com rhIGF, tampão citrato-fosfato numa gama de pH de 4,0-7,0. A actividade mitogénica em percentagem foi medida durante um período de oito semanas a uma temperatura de 50°C.

Figura 3. Efeito de várias espécies de tampões a pH 6,0 e pH 6,5 na estabilidade de rhIGF. Neste estudo foram formulados vários tampões com rhIGF-I. A integridade do pico principal foi medida durante um período de oito semanas a uma temperatura de 50°C. A integridade foi medida através de CN-RP-HPLC.

Figura 4. Efeito de várias espécies de tampões e pH 6,0 e pH 6,5 na estabilidade de rhIGF. A medição da percentagem de monómero (molécula pura) remanescente foi durante um período de oito semanas a uma temperatura de 50°C. A percentagem de monómero remanescente foi medida através de SDS-PAGE não redutor.

Figura 5. Efeito dos tampões citrato de sódio e succinato de sódio em várias concentrações na estabilidade de rhIGF-I. A estabilidade foi medida durante um período de oito semanas a 50°C. A medição foi efectuada doseando a percentagem de monómero através de SDS-PAGE não redutor.

Figura 6. Efeito dos tampões citrato de sódio e succinato de sódio em várias concentrações na estabilidade de rhIGF-I. A estabilidade foi medida através de doseamento de actividade mitogénica durante um período de oito semanas a 50°C.

Figura 7. Dados de um modelo de activação de nociceptor concebido para prever a dor na injeção induzida pelas formulações. Neste modelo, é utilizada capsaicina (um composto conhecido por provocar dor em injeção) (Santos et al. (1997) *Neuropeptides* 31:381-389) para gerar uma curva padrão. As formulações foram então testadas e dado um valor com base na curva padrão. Todas as formulações foram posteriormente com solução salina normal. Foram testados dois tampões e comparados com solução salina normal: ácido acético 87 mM, acetato de sódio 13 mM, pH 4,0; e succinato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 140 mM, pH 6,0. C1, C2 e C3 são diferentes concentrações de capsaicina.

Figura 8. Efeitos irritantes locais de formulações farmacêuticas injectadas subcutaneamente. Coelhos foram injectados com solução salina, um veículo de controlo (tampão sem agente farmacêutico), e um artigo teste (tampão mais agente farmacêutico) em três locais separados. A: succinato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 140 mM, pH 6,0; B: citrato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 135 mM, pH 6,0; C: ácido acético 87 mM, acetato de sódio 13 mM, cloreto de sódio 50 mM; D: metionina 1 mM, cloreto de sódio 135 mM, pH 6,0; E: succinato de sódio 10 mM, arginina 125 mM, cloreto de sódio 20 mM, pH 6,0; e F: sacarose 1,9%, cloreto de sódio 97 mM, pH 4,8.

Descrição detalhada do invento

O invento refere-se a uma composição farmacêutica injectável compreendendo IGF-1 e um tampão, em que o referido tampão consiste substancialmente num tampão succinato. As formulações farmacêuticas tamponadas com succinato provocam menos dor após injeção do que formulações similares contendo tampões não succinato, tais como tampões citrato, fosfato ou acetato.

O invento proporciona ainda uma composição do invento para utilização num método de tratamento, prevenção ou diagnóstico de uma doença ou estado, num sujeito humano ou animal através de injeção.

“Tampão succinato” significa tampão compreendendo um sal

de ácido succínico. Numa concretização preferida, o catião de succinato é sódio. Contudo, é expectável que qualquer catião seja eficaz. Outros possíveis catiões de succinato incluem, potássio, amónio, cálcio e magnésio. Numa concretização, o agente farmacêuticamente activo IGF-1 proporciona o catião.

As composições farmacêuticas do invento são substancialmente ou essencialmente tamponadas por um tampão succinato. Contudo, deverá entender-se que poderão estar presentes outros compostos nas composições do invento que possuem uma capacidade como tampões relativamente menor. Exemplos de tais compostos são o próprio agente farmacêuticamente activo, agentes estabilizadores, e similares.

O tampão succinato pode ser utilizado numa gama de concentrações desde 10 mM a 40 mM. As gamas adequadas de concentrações incluem 11-30 mM; 12-25 mM; 13-20 mM; 14-19 mM; e cerca de 15 mM. As gamas preferidas de concentrações de tampão succinato são inferiores a 40 mM, inferiores a 35 mM, inferiores a 25 mM, inferiores a 20 mM, e inferiores a 15 mM. Com maior preferência, a concentração do tampão é cerca de 10 mM.

Preferencialmente, o agente farmacêuticamente activo IGF-I encontra-se presente nas composições do invento numa concentração útil para a administração de uma quantidade farmacêuticamente eficaz do referido agente a um sujeito. O agente farmacêuticamente activo pode ser preparado a partir de qualquer fonte, incluindo purificação a partir de um mamífero, produção recombinante ou síntese química.

No presente invento, o agente farmacêuticamente activo é IGF-I (hIGF-I) ou uma variante biologicamente activa do mesmo. Com maior preferência, o agente farmacêuticamente activo é hIGF-I recombinante (rhIGF-I).

O termo "IGF-I", tal como aqui utilizado, refere-se a factor de crescimento semelhante a insulina I, na forma pura e variantes biologicamente activas. Variantes biologicamente activas adequadas podem ser fragmentos de IGF-I, análogos, e derivados. Preferencialmente o IGF-I é da mesma espécie da

que está a ser sujeita a tratamento. Contudo, o IGF-I do presente invento pode ser codificado por qualquer espécie animal incluindo, aves, caninos, bovinos, porcos, equinos e humanos.

O IGF-I pode ser purificado a partir de uma fonte natural, quimicamente sintetizado ou produzido de modo recombinante. O IGF-I humano tem sido purificado a partir de plasma e a sua sequência completa de aminoácidos encontra-se estabelecida (Rinderknech et al. (1978) *J. Biol. Chem.* 253:2769-2776). As sequências com homologias extensivas em relação ao IGF-I humano estão presentes no IGF-I purificado a partir do plasma de outras espécies.

As composições do presente invento podem incluir variantes biologicamente activas de IGF-I. As variantes de IGF-I diferem das moléculas de IGF-I de origem natural devido a modificação química ou a inserções, extinções, substituições de aminoácidos (incluindo aminoácidos quimicamente modificados), e truncagens ou fusões de carboxi ou amino terminais. Tais variantes deverão substancialmente ou completamente manter actividades suficientes do IGF-I para o tratamento benéfico de uma determinada anomalia. Em particular, as variantes deverão manter a capacidade de se fixar aos pontos dos receptores de IGF-I. As variantes de IGF-I são conhecidas pelos peritos na arte. Ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5374620.

"Substancialmente" significa que a actividade pode ser quantitativamente diferente, mas é qualitativamente a mesma. Quando uma proteína possui múltiplas actividades, uma variante pode possuir substancialmente a mesma actividade se possuir menos do que todas as actividades, desde que uma daquelas se mantenha. Preferencialmente, a variante possui pelo menos a mesma actividade do que a molécula pura.

A actividade do IGF-I pode ser medida utilizando bio-ensaios standard de IGF-I conhecidos pelos peritos na arte. Ensaio representativo incluem os conhecidos ensaios radioreceptor utilizando membranas placentárias (ver, por exemplo, Patente U.S. Nº 5324639; Hall et al. (1974) *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 39:973-976; e Marshall et al. (1974)

J. Clin. Endocrinol. and Metab. 39: 283-292), um bio-ensaio que mede a capacidade da molécula para potenciar a incorporação de timidina tritiada, de um modo dependente da dose, no ADN de fibroblastos BALB/c 3T3 (ver, por exemplo, Tamura *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 262:5616-5621), aqui incorporados como referências.

"Fragmento de IGF-I" designa um péptido que é somente uma parte da sequência e estrutura intactas de IGF-I. Inclui, mas não se encontra limitada a, uma exclusão C-terminal ou exclusão N-terminal de IGF-I. O termo "fragmento" pretende incluir qualquer porção da proteína que proporciona um segmento que substancialmente ou completamente mantém a(s) função(ões) biológica(s) essencial(is) da proteína. Os fragmentos podem ser obtidos a partir de qualquer fonte, tais como, por exemplo, a partir de sequências de péptidos de origem natural, sequências de péptidos sintéticas ou quimicamente sintetizadas, e sequências de péptidos geneticamente modificadas.

Análogo designa um análogo quer de IGF-I ou fragmento de IGF-I que compreende uma sequência e estrutura de IGF-I pura possuindo uma ou mais substituições, inserções ou exclusões de aminoácidos. Um análogo inclui uma proteína que é a mesma ou substancialmente similar em função à proteína pura. Por exemplo, um análogo da proteína IGF-I é uma proteína que não possui a mesma sequência de aminoácidos da proteína IGF-I mas que é suficientemente homóloga de modo a substancialmente ou completamente manter a actividade biológica. Os péptidos possuindo um ou mais peptóides (péptidos-mímicos) encontram-se igualmente abrangidos pelo termo "análogo" (ver Publicação Internacional N° WO 91/04282).

Modificações adequadas de IGF-I, fragmentos de IGF-I, ou seus respectivos análogos, incluem, mas não estão limitadas a glicosilação, fosforilação, PEGilação, ou outras adições de fragmentos estranhos, desde que a actividade da IGF-I fique substancialmente ou completamente retida. Tais modificações podem melhorar a solubilidade, absorção, tempo de semi-vida biológico do composto, diminuir a toxicidade da molécula, ou eliminar ou atenuar qualquer efeito secundário indesejável da molécula, etc. Derivados e especificamente, fragmentos

moleculares capazes de mediar tais efeitos são divulgados em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1981). Procedimentos para acoplamento de tais fragmentos a uma molécula são bem conhecidos na arte.

As variantes de IGF-I possuirão geralmente pelo menos 70%, preferencialmente 80%, mais preferencialmente 90% a 95% ou mais, e com maior preferência 98% ou mais em identidade de sequência de aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos da molécula de IGF-I de referência. Uma variante pode diferir tão pouco quanto 10, tão pouco quanto 5, tão pouco quanto 4, 3, 2, ou mesmo 1 resíduo aminoácido. "Identidade de sequência" designa os mesmos resíduos aminoácido que se encontram na variante de IGF-I e na molécula IGF-I de referência quando um segmento contíguo especificado da sequência de aminoácidos da variante é alinhado e comparado com a sequência de aminoácidos da molécula de referência. A identidade de sequência é determinada de acordo com o programa GAP Wisconsin Sequence Analysis Package, Versão 8 (disponível a partir de Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), utilizando as definições base.

Para efeitos do alinhamento óptimo das duas sequências, o segmento contíguo da sequência de aminoácidos da variante pode ter resíduos aminoácido adicionais ou resíduos aminoácido excluídos em relação à sequência de aminoácidos da molécula de referência. O segmento contíguo utilizado para comparação com a sequência de aminoácidos de referência compreenderá pelo menos vinte (20) nucleótidos contíguos, e podem ser 30, 40, 50, 100 ou mais nucleótidos. As correcções para aumento da identidade de sequência associadas com a inclusão de lacunas na sequência de aminoácidos da variante podem ser efectuadas atribuindo penalidades por abertura. Os métodos de alinhamento de sequência são bem conhecidos na arte.

Quando se considera a percentagem de identidade da sequência de aminoácidos, algumas posições de resíduos aminoácido podem diferir como resultado de substituições conservativa de aminoácidos, as quais não afectam as propriedades da função proteína. Nestas circunstâncias, a

identidade de sequência percentual pode ser ajustada para valores superiores de modo a contabilizar a similaridade dos aminoácidos conservativamente substituídos. Tais ajustes são bem conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Meyers and Miller (1988) *Computer Applic. Biol. Sci.* 4:11-17.

A arte proporciona orientação substancial no que diz respeito à preparação e utilização de tais análogos, tal como adiante discutido. Um fragmento de IGF-I incluirá geralmente pelo menos 10 resíduos aminoácido contíguos da molécula de cadeia completa, preferencialmente cerca de 15-25 resíduos aminoácido contíguos da molécula de cadeia completa, com maior preferência cerca de 20-50 ou mais resíduos aminoácido contíguos da IGF-I de cadeia completa. Ao preparar as variantes de IGF-I, um perito na arte pode facilmente determinar quais as modificações em relação ao nucleótido da proteína pura ou sequência de aminoácidos resultarão numa variante que permite a preparação da forma fortemente concentrada da variante de IGF-I de acordo com os métodos divulgados no presente invento. Estas serão geralmente substituições conservativas de aminoácidos que preservam a carga do resíduo substituído (por exemplo, ácido aspártico em lugar de ácido glutâmico).

Vários análogos e fragmentos de IGF-I são bem conhecidos na arte e incluem os descritos em, por exemplo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:4904-4907; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1987) 149:398-404; *J. Biol. Chem.* (1988) 263:6233-6239; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1989) 165:766-771; Forsbert et al. (1990) *Biochem. J.* 271:357-363; Patentes U.S. N^{os} 4876242 e 5077276; e Publicações Internacionais N^{os} WO 87/01038 e WO 89/05822. Análogos representativos incluem um com uma exclusão de Glu-3 da molécula madura, análogos possuindo até 5 aminoácidos truncados a partir do N-terminal, um análogo com uma truncagem dos 3 primeiros aminoácidos N-terminais (referido como des(I3)-IGF-I, des-IGF-I, tIGF-I, ou IGF cerebral), e um análogo incluindo os primeiros 17 aminoácidos da cadeia B da insulina humana em lugar dos primeiros 16 aminoácidos da IGF-I humana.

Os métodos para obtenção de fragmentos, análogos, e derivados de IGF-I encontram-se disponíveis na arte. Ver de

modo geral as Patentes U.S. N^{os} 4738921, 5158875 e 5077276; Publicações Internacionais N^{os} WO 85/00831, WO 92/04363, WO 87/01038 e WO 89/05822; e Patentes Europeias N^{os} EP 135094, EP 123228 e EP 128733.

O IGF-I pode ser proveniente de qualquer espécie animal incluindo, mas não estando limitado a, aves, caninos, bovinos, porcinos, equinos, e humanos. Preferencialmente o IGF-I é proveniente de uma espécie mamífera quando o tratamento é para uma desordem com resposta à IGF-I mamífera, e mais preferencialmente é proveniente de um mamífero da mesma espécie do que o mamífero sujeito a tratamento para tal desordem. É reconhecido que o IGF-I pode ser obtido através de métodos recombinantes utilizando a sequência codificada correspondente para a IGF-I da espécie animal de interesse. Tais métodos recombinantes são discutidos adiante em maior detalhe.

As variantes de IGF-I biologicamente activas deverão manter as actividades de IGF-I, particularmente a capacidade de fixação aos pontos dos receptores de IGF-I. A actividade do IGF-I pode ser medida utilizando bio-ensaios standard de IGF-I. Ensaios representativos incluem os conhecidos ensaios de radioreceptor utilizando membranas placentárias (ver, por exemplo, Patente U.S. N^o 5324639; Hall et al. (1974) *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 39:973-976; e Marshall et al. (1974) *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 39: 283-292), um bio-ensaio que mede a capacidade da molécula para potenciar a incorporação de timidina tritiada, de um modo dependente da dose, no ADN de fibroblastos BALB/c 3T3 (ver, por exemplo, Tamura et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 262:5616-5621), e similares; aqui incorporados como referências. Preferencialmente, a variante possui pelo menos a mesma actividade do que a molécula pura.

A IGF-I utilizada na obtenção das composições do presente invento pode encontrar-se nas suas formas substancialmente purificada, pura, produzida de modo recombinante, ou quimicamente sintetizada. Por exemplo, a IGF-I pode ser isolada directamente a partir do sangue, tal como a partir do soro ou plasma, através de métodos conhecidos. Ver, por exemplo, Phillips (1980) *New Eng. J.*

Med. 302:371-380; Svoboda et al. (1980) *Biochemistry* 19:790-797; Cornell and Boughdady (1982) *Prep. Biochem.* 12:57; Cornell and Boughdady (1984) *Prep. Biochem.* 14:123; Patente europeia N° EP 123228; e Patente U.S. N° 4769361.

Em alternativa, a IGF-I pode ser sintetizada quimicamente, através de uma qualquer de várias técnicas que são conhecidas pelos peritos na arte dos péptidos. Ver, por exemplo, Li et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2216-2220, Stewart and Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois), e Barany and Merrifield (1980) *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, ed. Gross and Meienhofer, Vol. 2 (Academic Press, New York, 1980), pp. 3-254, para as técnicas de síntese de péptidos em fase sólida, e Bodansky (1984) *Principles of Peptide Synthesis* (Springer-Verlag, Berlin); e Gross and Meienhofer, eds. (1980) *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1 (Academic Press, New York), para síntese clássica em solução. O IGF-I pode igualmente ser quimicamente preparado pelo método de síntese múltipla simultânea de péptidos. Ver, por exemplo, Houghten (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5131-5135; e Patente U.S. N° 4631211.

A modificação genética através de técnicas de ADN recombinante pode ser o modo mais eficaz de produzir IGF-I. A sequência no ADN humano que codifica o IGF-I é conhecida e pode ser introduzida em células hospedeiras para expressão. O IGF-I pode ser produzido através de técnicas de ADN recombinante em células de *E.coli*, levedura, insectos e mamíferos. O IGF-I segregado pode ser obtido adicionando uma sequência sinal à sequência de DNA que codifica IGF-I. Além disso, a sequência de DNA que codifica IGF-I pode ser manipulada para se obterem fragmentos, análogos, ou derivados de IGF-I. Tais técnicas de ADN recombinante encontram-se geralmente disponíveis na arte. Ver, por exemplo, Publicação Internacional N° WO 96/07424, onde proteína IGF-I humana recombinante é produzida em levedura.

A concentração apropriada de IGF-I nas composições do invento depende da solubilidade no tampão específico utilizado e da quantidade terapêutica pretendida para a dose requerida. Tipicamente, a concentração de IGF-I nas

composições líquidas do invento variará de 0,01-200 mg/ml. Preferencialmente a concentração de IGF-I é 0,1-20,0 mg/ml, e mais preferencialmente 2,0-10,0 mg/ml.

A composição farmacêutica compreendendo um IGF-I e um tampão succinato pode igualmente conter outros componentes que auxiliam o tratamento com IGF. Tais componentes incluem proteínas que se ligam a IGF-I, receptores IGF-I, e a sub-unidade lábil a ácido do complexo ligante de IGF. É geralmente conhecido que a acção do IGF-I na cartilagem é modulada através de proteínas que se ligam a IGF-I, seis das quais pelo menos (IGFBP-1 a IGFBP-6) foram isoladas (ver Baxer et al. (1989) *Prog. Growth Factors Res.* 1:49-68; e Rechler et al. (1992) *Growth Regul.* 2:55-68). Destas. A IGFBP-3 é a principal proteína ligante para IGF-I. A sua presença pode potenciar o efeito estimulador do IGF-I na síntese de proteoglicano (ver Chevalier et al. (1996) *British J. Rheumat.* 35:515-522). Além disso, foi igualmente demonstrado que uma glicoproteína lábil a ácido está associada ao complexo de proteína formado por IGF-I e as suas proteínas ligantes. Deste modo, a composição farmacêutica do invento pode conter tal glicoproteína lábil a ácido e proteínas ligantes a IGF-I, quando se comprova que auxiliam o efeito pretendido do IGF-I na manutenção e/ou regeneração da cartilagem.

A quantidade de IGFBP's a ser administrada com IGF-I pode ser determinada de acordo com razão molar entre IGF-I e IGFBP's. Esta razão molar pode variar de 0,5:1 a 3:1, preferencialmente 1:1 (ver patente U.S. Nº 5187151). Todas essas referências aos componentes que auxiliam a manutenção e/ou regeneração da cartilagem promovida por IGF-I são aqui incorporadas como referências.

A composição farmacêutica de IGF-I de acordo com o presente invento pode ainda compreender um ou mais de outros agentes terapêuticos que sejam eficazes no tratamento de outras desordens no indivíduo, desde que as acções bioquímicas dos agentes terapêuticos adicionais não interfiram com a eficácia da acção pretendida do tratamento com IGF-I. Exemplos de tais agentes incluem antibióticos, agentes anti-inflamatórios, e similares.

As composições farmacêuticas do invento podem incluir um ou mais inibidores da protease. Um exemplo de inibidor da protease é o pentosano polissulfato de sódio (PPS), um polissacárido polisulfatado.

As composições do invento podem opcionalmente incluir agentes estabilizadores incluindo, aminoácidos (tais como arginina, lisina e glicina), açúcares (tais como sacarose, manitol e trealose), sais (tais como NaCl e MgCl₂), tensioactivos, PEG, conservantes, agentes anti-microbianos, agentes complexantes (tais como EDTA), e anti-oxidantes. Para o hIGF-I, as formulações podem incluir baixos níveis de metionina, tal como 1 mM, de modo a tornar mais lenta a oxidação e preservar contra a agregação ou precipitação da proteína.

Preferencialmente, a composição farmacêutica é isotónica com as células do sujeito. Preferencialmente a composição farmacêutica é isotónica com os eritrócitos de um sujeito. Mais preferencialmente, a composição farmacêutica é isotónica com os eritrócitos humanos. Deste modo, numa concretização, a composição farmacêutica contém uma concentração suficiente de pelo menos um agente tonificante de modo que a composição seja isotónica.

"Isotónica" designa uma solução na qual uma célula não encolha nem dilata. Um exemplo de uma solução isotónica é cloreto de sódio a 0,9% em água. Tipicamente, uma solução possuirá aproximadamente a mesma pressão osmótica do que a fase líquida das células ou tecidos de um sujeito. Contudo, uma solução que seja isosmótica com fluido intra-ceular não será isotónica se contiver um soluto que atravesse livremente as membranas da célula. Para determinar se uma solução é isotónica, é necessário identificar a concentração de solutos à qual as células manterão o seu tamanho e forma normais. Métodos de determinação da isotonicidade de uma solução são bem conhecidos pelos peritos na arte. Ver, por exemplo, Setnikar et al. (1959) *JAPhA Sci Ed* 48:628.

Numa concretização preferida, a composição farmacêutica compreende ainda cloreto de sódio. O cloreto de sódio é incluído para proporcionar isotonicidade à formulação. Deste

modo, a concentração do cloreto de sódio na formulação dependerá da contribuição de outros componentes para a /tonicidade. Preferencialmente, a concentração de cloreto de sódio é cerca de 140 mM.

Os peritos na arte estão familiarizados com uma variedade de solutos farmacêuticamente aceitáveis úteis em proporcionar isotonicidade em composições farmacêuticas. Deste modo, as composições do invento abrangem ainda componentes que podem ser utilizados para proporcionar isotonicidade, por exemplo, cloreto de sódio, glicina, manitol, glicerol, sacarose, e outros hidratos de carbono, ácido acético, outros ácidos orgânicos ou seus sais, e quantidades relativamente pequenas de citratos ou fosfatos. O técnico com conhecimentos médios saberia acerca de agentes adicionais que são adequados para proporcionar tonicidade óptima.

O pH da composição farmacêutica afecta tanto o nível de dor após injeção como a estabilidade do ingrediente farmacêuticamente activo. Um determinado ingrediente farmacêuticamente activo possuirá maior estabilidade numa determinada gama de pH de um determinado tampão. O pH óptimo que proporciona o balanço pretendido de estabilidade e dor mínima ou ausência desta após injeção pode ser determinado pelos peritos na arte. Contudo, a gama de pH pode abranger formulações de pH 4,0-7,5. pH's adequados incluem 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5. As gamas adequadas de pH são 4,5-7,2; 4,6-7,1; 4,7-7,0; 4,8-6,9; 4,9-6,8; 5,0-6,7; 5,1-6,6; 5,2-6,5; 5,3-6,4; 5,4-6,3; 5,5-6,2; 5,7-6,1; e 5,8-6,0. Uma gama preferida é pH 4,6-6,6. O mais preferido é pH 5,6. Para composições contendo IGF-I, o pH preferido é 6,0.

A composição farmacêutica pode ser formulada sob a forma de solução, suspensão ou emulsão. Pode igualmente encontrar-se na forma de pó liofilizado, o qual pode ser convertido em solução, suspensão, ou emulsão antes de administração. O armazenamento pode ser facilitado adicionando proteínas tais como albumina humana que pode reduzir a perda de actividade

da proteína farmacologicamente activa. Deste modo, a albumina poderia funcionar como proteína estabilizante durante o processo de liofilização. Os métodos para formular uma composição farmacêutica são geralmente conhecidos na arte. Uma discussão completa acerca de formulação e selecção de suportes, estabilizantes, e osmólitos farmacologicamente aceitáveis pode ser encontrada em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) (18th ed., Mack Pub. Co., Eaton Pennsylvania).

O agente farmacologicamente activo pode também ser formulado numa forma de libertação controlada para prolongar a presença do agente farmacologicamente activo no mamífero em tratamento, geralmente não mais que um dia. São conhecidos na arte muitos métodos de preparação de formulações de libertação controlada e são divulgados em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) (18th ed. Mack Pub. Co., Eaton Pennsylvania). Geralmente, o agente pode ser ocluído em matrizes semi-permeáveis de polímeros sólidos hidrófobos. As matrizes podem ser moldadas em filmes ou micro-cápsulas.

Exemplos de tais matrizes incluem poliésteres, co-polímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato (Sidman et al. (1983) *Biopolymers* 22:547-556), polilactídeos (Patente U.S. N° 3773919 e EP 58481), polilactato poliglicolato (PLGA), hidrogéis (ver, por exemplo, Langer et al. (1981) *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277; Langer (1982) *Chem. Tech.* 12:98-105); etileno-vinil acetato não degradável, co-polímeros ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tais como Lupron Dept^{MR}, e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133988). Micro-cápsulas adequadas podem igualmente incluir hidroximetilcelulose ou micro-cápsulas de gelatina e micro-cápsulas de poli-metilmetacrilato preparadas por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial. Além disso, podem ser igualmente utilizadas micro-emulsões ou sistemas coloidais de administração de fármacos tais como lipossomas e micro-esferas de albumina. Ver *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) (18th ed. Mack Pub. Co., Eaton Pennsylvania)

As composições do invento, compreendendo o agente farmacologicamente activo e um composto succinato, podem ser armazenadas durante períodos prolongados de tempo mantendo a integridade física e biológica do agente farmacologicamente

activo. A armazenagem pode ser na forma líquida ou sob a forma de formulação seca, a qual pode ser reconstituída adicionando líquido. Quando os agentes farmacêuticamente activos são proteínas, a armazenagem pode ser facilitada através de processos de secagem, tais como liofilização. Em conformidade, a proteína pode ser armazenada na forma de uma composição liofilizada. Deste modo, numa concretização, o invento proporciona uma composição farmacêutica liofilizada compreendendo um composto succinato e o agente farmacêuticamente activo.

A gama de temperaturas à qual é possível a armazenagem de uma preparação líquida de um agente farmacêuticamente activo e succinato é de 2°C a 8°C, com um tempo de armazenamento expectável de 18-24 meses ou mais. A gama de temperaturas à qual é possível a armazenagem de uma preparação seca de um agente farmacêuticamente activo e succinato é de 2°C a 30°C, com um tempo de armazenamento expectável de 18-24 meses ou mais. Contudo, as formulações podem ser armazenadas, até durante 5 anos. Uma outra gama para formulação seca é de 22°C a 30°C. As temperaturas preferidas incluem, mas não estão limitadas a, 2°C a 8°C para a líquida, e temperatura ambiente (*i.e.* 25°C-30°C) para a seca. As formulações líquidas e secas são estáveis durante cerca de 18-24 meses ou mais. A formulação de rhIGF-I especificamente divulgada tem demonstrado ser estável durante pelo menos um ano a 2-8°C na forma líquida.

A composição farmacêutica é preferencialmente esterilizada por filtração em membrana e é armazenada em recipientes uni-dose ou multi-dose tais como frasco selados ou ampolas. Numa concretização do invento, o espaço de cabeça dos frascos pode ser purgado com azoto no enchimento. O invento abrange igualmente dispositivos para doseamento conveniente, tais como seringas pré-preenchidas, auto-injectores, blísteres ou sistemas sem agulha, para facilitar a administração ou injeção.

Uma quantidade farmacêuticamente aceitável da composição do invento é administrada a um sujeito. Quantidade farmacêuticamente aceitável significa uma quantidade que é útil no tratamento, prevenção ou diagnóstico de uma doença ou

estado.

O termo "administrar" designa qualquer método adequado para administrar um agente farmacologicamente activo a um sujeito, incluindo parentérico, intranasal, intrapulmonar, oral, tópico, anal ou implantação cirúrgica ou inserção. As vias parentéricas de administração típicas incluem injeção ou infusão intravenosa, intramuscular, subcutânea, intra-arterial e intra-peritoneal. Preferencialmente a administração é efectuada por injeção. Em concretizações preferidas, a injeção é subcutânea. As formas injectáveis das composições do invento incluem, mas não estão limitadas a, soluções, suspensões e emulsões.

"Sujeito" designa um animal. Preferencialmente o sujeito é um mamífero, sendo o mais preferido um humano. Os mamíferos de particular importância além dos humanos incluem, cães, gatos, vacas, cavalos, ovelhas e porcos.

Quando a administração tem como objectivo o tratamento, a administração pode ser quer com o objectivo profilático quer terapêutico. Quando administrada profilacticamente, a substância é administrada antes de qualquer sintoma. A administração profilática da substância serve para prevenir ou atenuar qualquer sintoma subsequente. Quando administrada terapêuticamente, a substância é administrada no início (ou pouco tempo após) de um sintoma. A administração terapêutica da substância serve para atenuar qualquer sintoma presente.

A composição farmacêutica compreendendo IGF-I reconstituído deverá ser formulada numa unidade de dosagem e numa forma injectável ou de infusão tal como uma solução, suspensão, ou emulsão. Poderá igualmente estar na forma de pó liofilizado, o qual pode ser convertido em solução, suspensão ou emulsão antes de administração. A composição farmacêutica compreendendo IGF-I reconstituído é preferencialmente esterilizada por filtração em membrana e é armazenada em recipientes uni-dose ou multi-dose tais como frascos selados ou ampolas.

Um suporte farmacologicamente aceitável deverá ser misturado com o agente farmacologicamente activo e o tampão

succinato. "Suporte farmacêuticamente aceitável" designa um suporte que é convenientemente utilizado na arte de modo a facilitar a armazenagem, administração, e/ou o efeito curativo dos ingredientes terapêuticos. Um suporte pode também reduzir quaisquer efeitos secundários indesejáveis do IGF-I. Um suporte adequado deverá ser estável, *i.e.*, incapaz de reagir com outros ingredientes na formulação. Não deverá produzir efeitos adversos locais ou sistêmicos significativos em recipientes nas dosagens e concentrações utilizadas para tratamento. Tais suportes são geralmente conhecidos na arte. Suportes adequados para este invento são as macro-moléculas extensas e estáveis convencionalmente utilizadas tais como albumina, gelatina, colagénio, polissacárido, monossacáridos, polivinil-pirrolidona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, aminoácidos poliméricos, óleos fixos, oleato de etilo, lipossomas, glicose, sacarose, lactose, manose, dextrose, dextrano, celulose, manitol, sorbitol, polietileno glicol (PEG), e similares. Os suportes de libertação prolongada, tais como o ácido hialurónico, podem igualmente ser adequados. Ver principalmente Bragantini (1987) *Clin. Trials J.* 24(4):333-340; Dougados et al. (1993) *Osteoarthritis and Cartilage* 1:97-103; e Lussier et al. (1996) *J. Rheum.* 23:1579-1585.

A composição farmacêutica pode adicionalmente compreender um agente solubilizante ou o denominado adjuvante de solubilidade. Os compostos contendo um grupo guanidino, sendo o mais preferido a arginina, são adjuvantes de solubilidade adequados.

O método para formular uma composição farmacêutica é geralmente conhecido na arte. Uma discussão extensa de formulação e selecção de suportes, estabilizantes, e osmólitos farmacêuticamente aceitáveis pode ser encontrada em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th ed. Mack Pub. Co., Eaton Pennsylvania, 1990).

As composições farmacêuticas compreendendo IGF-I são úteis em terapia direccionada para o tratamento de condições que respondem ao IGF-I. "Estados que respondem ao IGF-I" significa qualquer estado que responde no curto prazo ou no longo prazo quer positivamente quer negativamente ao IGF-I.

Tais estados com resposta ao IGF-I podem ser um estado normal. Por exemplo, um mamífero pode ser submetido a terapia com IGF-I para aumentar a massa muscular normal onde maior massa de músculo for pretendida, tal como num atleta. Em contraste, o estado que responde ao IGF-I pode ser um estado anormal que é crónico, e deste modo ocorre mais ou menos de modo contínuo, ou que é agudo, dado que ocorre a seguir a um ferimento num local, tal como uma lesão numa articulação ou osso.

Os estados com resposta ao IGF-I incluem estados agudos ou crónicos incluindo, mas não estando limitados a, desordens hiperglicémicas, incluindo todas as formas de diabetes; doença crónica de pulmões; desordens renais agudas e crónicas; deficiência aguda ou crónica no fígado; cirrose hepática; respostas inflamatórias, tais como artrite reumatóide, artrite psoriática, síndrome de Reiter, e doença inflamatória do intestino; intestino curto; lesões isquémicas envolvendo o coração, fígado, ou cérebro, ou como resultado de necrose renal tubular; desordens imunológicas, tais como imunodeficiências incluindo tolerância imunitária reduzida lesões de tecidos induzidas por quimioterapia; rejeição de órgãos após transplante; doenças ou insuficiências de estrutura ou função cardíaca, tais como condições cardíacas crónicas, cardiomiopatia, apoplexia, e falha congestiva cardíaca; retardamento do crescimento, osteoporose; tratamento de feridas; lesões ósseas; doenças oftálmicas; infertilidade; desordens neurodegenerativas, tais como doença dos motoneurónios, esclerose múltipla, distrofia muscular, neuropatia diabética, neuropatias desmielinizantes periféricas, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, e uma sequela de lesões traumáticas na medula espinal; e desordens da cartilagem articular, tais como osteoartrite e lesões relacionadas com traumas. Quaisquer desordens com resposta ao IGF-I pode beneficiar da administração das composições farmacêuticas compreendendo o xarope de IGF-I ou o IGF-I reconstituído obtido daquele do presente invento.

“Tratamento” designa tratamento de um estado normal existente que é potenciado pelo agente farmacêuticamente activo, tratamento terapêutico de um estado anormal existente, e procedimentos preventivos ou profiláticos

realizados antes da ocorrência de uma desordem anormal.

As composições farmacêuticas do invento podem ser utilizadas para o tratamento de qualquer mamífero. Exemplos de mamíferos incluem gatos, cães, cavalos, vacas, ovelhas, porcos, e mais preferencialmente humanos.

Exemplos

Métodos

O IGF-I para utilização nestas experiências foi produzido de modo recombinante na estirpe de levedura *Pichia pastoris* e purificado essencialmente tal como descrito nas patentes U.S. N^{os} 5324639, 5324660 e 5650496 e Publicação Internacional N^o WO 96/40776.

HPLC de Fase Inversa

A separação e quantificação das espécies rhIGF-I foram alcançadas com Cromatografia Líquida de Alta Pressão de Fase Ciano-Inversa (CN-RP-HPLC). As separações foram realizadas numa coluna ciano Zorbax 300SB-CN, 4,6 mm ID x 15 cm, 5 μ , com detecção da amostra a 214 nm. As amostras foram diluídas em água para uma concentração comum de 0,8 mg/ml e os volumes de injeção foram de 20 μ l (~16 μ g de proteína por solução). A eluição foi realizada com um gradiente de acetonitrilo/água/ácido trifluoroacético (TFA) 0,2% desde aproximadamente 25% de acetonitrilo (ACN) até 34% de ACN durante 25 minutos.

O perfil CN-RP-HPLC do rhIGF-I contém picos representando rhIGF-I "autêntico", o qual é integralmente activo, e vários outros picos contendo espécies menores de rhIGF-I. Estas espécies menores são variantes do rhIGF-I "autêntico" que contêm pequenas modificações químicas na molécula da proteína (por exemplo, resíduos metionina oxidados, glicosilação, etc.). Ao Tempo 0, o pico cromatográfico correspondente ao rhIGF-I "autêntico" compreende aproximadamente 95% da área total de todos os picos. Este pico, contendo rhIGF-I "autêntico" é referido como o "Pico Principal". Para estimar a cinética da

degradação do rhIGF-I por CN-RP-HPLC em estudos de estabilidade, a percentagem de área do Pico Principal é monitorada com função do tempo sob um determinado conjunto de condições de armazenamento. À medida que o rhIGF-I se degrada, a percentagem de área do Pico Principal diminui à medida que a percentagem de área dos picos correspondentes aos produtos de degradação de rhIGF-I aumenta.

SDS-PAGE não redutor

Os agregados covalentes do rhIGF-I, os quais ocorrem devido à formação de dissulfuretos intermoleculares, podem ser detectados em géis de SDS-PAGE não redutor. Para esta análise, foi levada a cabo um SDS-PAGE não redutor com 18% de Tris-Glicina. Os géis foram utilizados a corrente constante e corados com Coomassie coloidal. Os géis descorados foram analisados com um densitómetro e as bandas foram convertidas em áreas de picos.

Ao Tempo 0, o rhIGF-I compreende uma única banda monomérica no SDS-PAGE não redutor. Esta banda (*i.e.* a banda do Monómero) compreende 100% da área total do pico ao Tempo 0. Para determinar a cinética da degradação do rhIGF-I através de SDS-PAGE não redutor em estudos de estabilidade, a percentagem de área do monómero é monitorizada como função do tempo sob um determinado conjunto de condições de armazenamento. À medida que o rhIGF-I se degrada, a percentagem de área do Monómero diminui e a percentagem de área das outras bandas correspondentes aos produtos de degradação de rhIGF-I (por exemplo, dímeros, trímeros, etc.) aumenta.

Bioensaio mitogénico

As bioactividades das amostras de rhIGF-I foram determinadas utilizando um ensaio mitogénico de acordo com o procedimento de W. Lopaczynski *et al.* (1993) *Regulatory Peptides*, 48:207-216. Este ensaio é baseado na indução dependente da dose de uma proliferação celular por rhIGF-I. A resposta é medida com coloração por MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il)]-2,5-difeniltertazolio), o qual é reduzido para um produto corado pelas enzimas mitocondriais

das células vivas MG-63 (American Type Culture Collection (ATCC CRL 1427)). O ensaio foi padronizado em relação a um padrão WHO para proporcionar a actividade do rhIGF-I em Unidades Internacionais (UI). A % de actividade do rhIGF-I é determinada em estudos de estabilidade por comparação da actividade da amostra com um padrão de referência de actividade conhecida.

Exemplo 1

Este exemplo ilustra a estabilidade do rhIGF-I como função do pH da formulação. Para a Figura 1, foi formulado com rhIGF-I, tampão citrato-fosfato numa gama de pH de 4,0-7,0. A integridade percentual do pico principal (pico que contém a molécula pura) foi medida durante um período de oito semanas a uma temperatura de 50°C. A medição foi efectuada por CN(ciano)-RP-HPLC. Para a Figura 2, foi formulado com rhIGF, tampão citrato-fosfato numa gama de pH de 4-7. A actividade em percentagem foi medida durante um período de oito semanas a uma temperatura de 50°C. A medição de actividade foi através de bioensaio mitogénico. Os resultados do Exemplo 1 indicam que o pH 6,0 permite a manutenção de estabilidade adequada do rhIGF-I numa formulação farmacêutica.

Exemplo 2

Este exemplo ilustra a estabilidade do rhIGF-I a pH 6,0 e pH 6,5 como função do tipo de tampão. Para a Figura 3, foram formulados vários tampões com rhIGF-I. A integridade do pico principal foi medida durante um período de oito semanas a uma temperatura de 50°C. A integridade foi medida por RN-RP-HPLC. Para a Figura 4, a medição da percentagem de monómero (molécula pura) remanescente ocorreu durante um período de oito semanas a uma temperatura de 50°C. A percentagem de monómero remanescente foi medida por SDS-PAGE não redutor. Os resultados apresentados neste exemplo indicam que (1) as formulações a pH 6,0 proporcionam maior estabilidade do que as formulações a pH 6,5; e (2) os tampões citrato de sódio e succinato de sódio são altamente compatíveis com rhIGF-I a pH 6,0.

Exemplo 3

Este exemplo ilustra a estabilidade do rhIGF-I como função da concentração de citrato de sódio e succinato de sódio a pH 6,0. Para a Figura 5, a estabilidade foi medida durante um período de oito semanas a 50°C. As medições foram efectuadas doseando a percentagem de monómero através de SDS-PAGE não redutor. Para a Figura 6, a estabilidade foi medida por doseamento da actividade durante um período de oito semanas a 50°C. A medição da actividade foi efectuada por ensaio mitogénico. O resultado neste exemplo indica que os tampões succinato são mais compatíveis com o rhIGF-I do que os tampões citrato, e que a concentração de 10 mM é óptima para a estabilidade do rhIGF-I.

Exemplo 4

Este exemplo apresenta dados de um modelo de activação de nociceptor concebido para prever a dor da injeção produzida pelas formulações. Neste modelo, é utilizada capsaicina (um composto conhecido por provocar dor em injeção) para gerar uma curva padrão. As formulações foram posteriormente testadas e atribuído um valor com base na curva padrão. Todas as formulações foram posteriormente comparadas com solução salina normal. Foram testados dois tampões e comparados com solução salina normal: acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0; e succinato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 140 mM, pH 6,0. A formulação com acetato gerou uma resposta fora da curva padrão indicando dor significativa na injeção. A formulação com succinato 10 mM demonstrou não ser mais dolorosa do que a de solução salina normal.

Exemplo 5

O estudo descrito neste exemplo foi realizado para determinar os potenciais efeitos irritantes locais das formulações farmacêuticas em coelhos brancos New Zealand quando administradas através de injeções subcutâneas durante sete dias consecutivos. Os artigos teste (tampão mais IGF), os controlos do suporte (tampão isolado), e solução salina foram administrados a cada coelho em três pontos diferentes. Foram administrados aos coelhos 0,5 ml de solução

salina/suporte/artigo teste, em cada um dos pontos teste designados, uma vez por dia durante sete dias consecutivos através de injeção subcutânea. Os pontos teste foram examinados em relação a sinais de eritrema e edema e o sinal registado cada dia antes de administração e nos dias oito e nove de acordo com um sistema de graduação baseado em Draize (*Appraisal of the Safety of Chemicals in Food, Drugs and Cosmetics*) (1959), the Association of Food and Drug Officials of the United States, pp. 49-51). Todos os pontos de injeção e quaisquer lesões graves foram cortadas e processadas em blocos de parafina. As secções de tecido foram coradas com hematoxilina e eosina e examinadas microscopicamente por um patologista veterinário acreditado. O processamento histológico foi realizado por Histo Technics, Powell, Ohio. Os resultados da histopatologia indicam que os pontos de controlo de injeção de solução salina e suporte apresentavam inflamação relativamente moderada e eram comparáveis com a excepção de um ponto de controlo com solução salina com inflamação grave. Os pontos de injeção do artigo teste que apresentavam maior inflamação ocorreram nos artigos teste C e D. Os restantes artigos teste não apresentavam diferenças significativas entre eles, mas provocaram inflamação ligeiramente superior que os artigos de controlo solução salina e suporte. Os controlos veículo A, B, D, e F, eram comparáveis com o da solução salina. Em conformidade, apesar de ter sido notada irritação dérmica externa moderada em vários pontos esporadicamente ao longo do estudo, não foi necessária uma indicação da histopatologia resultante. Com ênfase na histopatologia no ponto de injeção, os artigos teste C e D foram considerados como excepcionais, apresentando somente inflamação moderada quando comparados com os restantes artigos teste, os quais apresentavam somente uma inflamação ligeiramente superior em relação aos seus respectivos controlos solução salina/suporte.

Foram utilizadas as seguintes formulações:

- (1) Foi usada solução salina a 0,9%;
- (2) Os artigos teste incluíam o tampão suporte (abaixo) mais 8,9 mg/ml de rhIGF-I; e
- (3) Suporte de Controlo A - succinato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 140 mM, pH 6,0;

Suporte de Controlo B - citrato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 135 mM, pH 6,0;

Suporte de Controlo C - acetato de sódio 0,1 M, cloreto de sódio 50 mM;

Suporte de Controlo D - metionina 1 mM, cloreto de sódio 135 mM, pH 6,0;

Suporte de Controlo E - succinato de sódio 10 mM, arginina 125 mM, cloreto de sódio 20 mM, pH 6,0; e

Suporte de Controlo F - citrato de amónio 7,4 mM, sacarose 1,9%, cloreto de sódio 97 mM, pH 4,8.

Os resultados são apresentados na Figura 8. Os resultados demonstram que o succinato (artigo teste A) proporcionou um meio eficaz para injeção subcutânea.

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica injectável que compreende factor de crescimento humano I (IGF-I) semelhante a insulina ou uma sua variante biologicamente activa e um tampão, em que o referido tampão consiste substancialmente em succinato numa concentração de 10 mM a 40 mM e um contra-íão, e em que a referida variante é um polipéptido possuindo actividade IGF-I e pelo menos 70% de identidade em aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos do IGF-I humano.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o referido contra-íão é seleccionado a partir de sódio, potássio, amónio e o referido IGF-I.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a concentração de succinato é de 10 mM a 30 mM.

4. Composição de acordo com a reivindicação 3, em que a concentração de succinato é de 10 mM a 20 mM.

5. Composição de acordo com a reivindicação 4, em que a concentração de succinato é cerca de 10 mM.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida composição possui um pH de 4,0 a 7,0.

7. Composição de acordo com a reivindicação 6, em que o referido pH é de 4,6 a 6,6.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que o referido pH é cerca de 6,0.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, que compreende adicionalmente uma concentração suficiente de pelo menos um agente tonificante de tal modo que a composição seja isotónica.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9, em que o referido agente tonificante é cloreto de sódio.

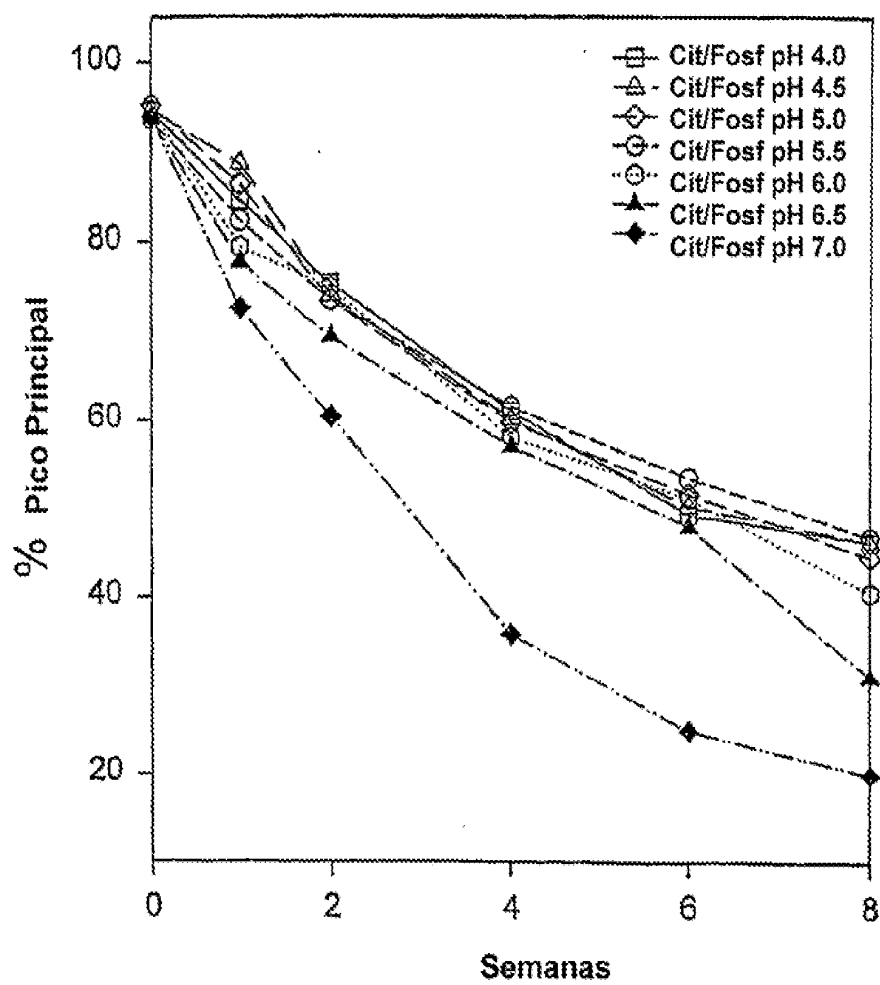
11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido IGF-I humano é IGF-I humano recombinante.

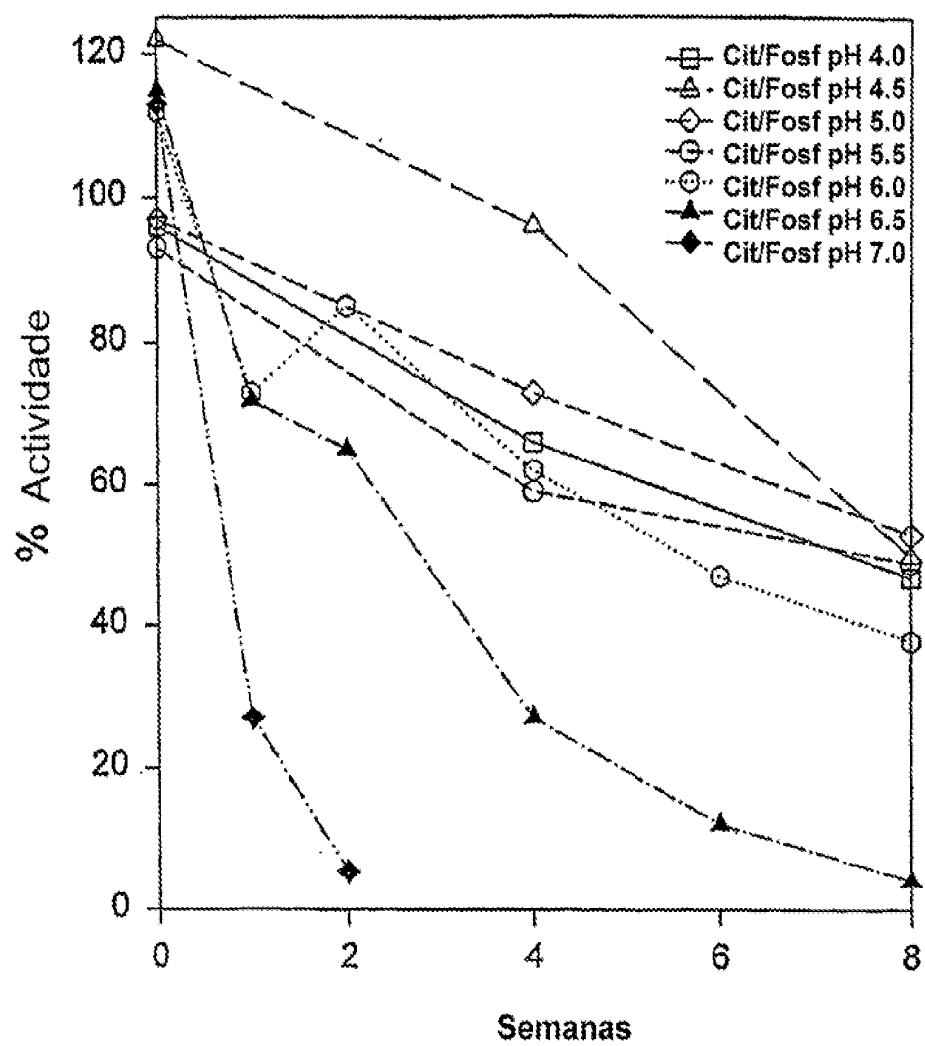
12. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 11, em que a referida composição possui um pH de cerca de 6,0, a concentração do referido succinato é cerca de 10 mM, e a composição compreende ainda cerca de 140 mM de cloreto de sódio.

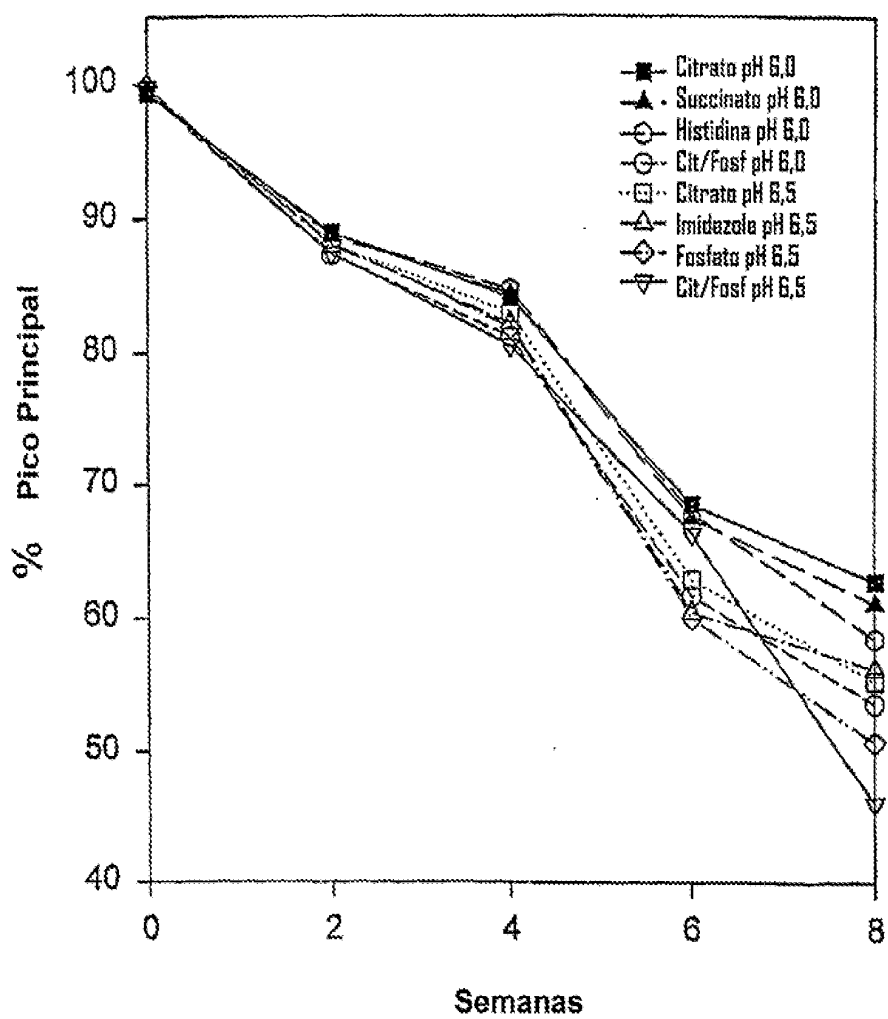
13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida composição é um líquido.

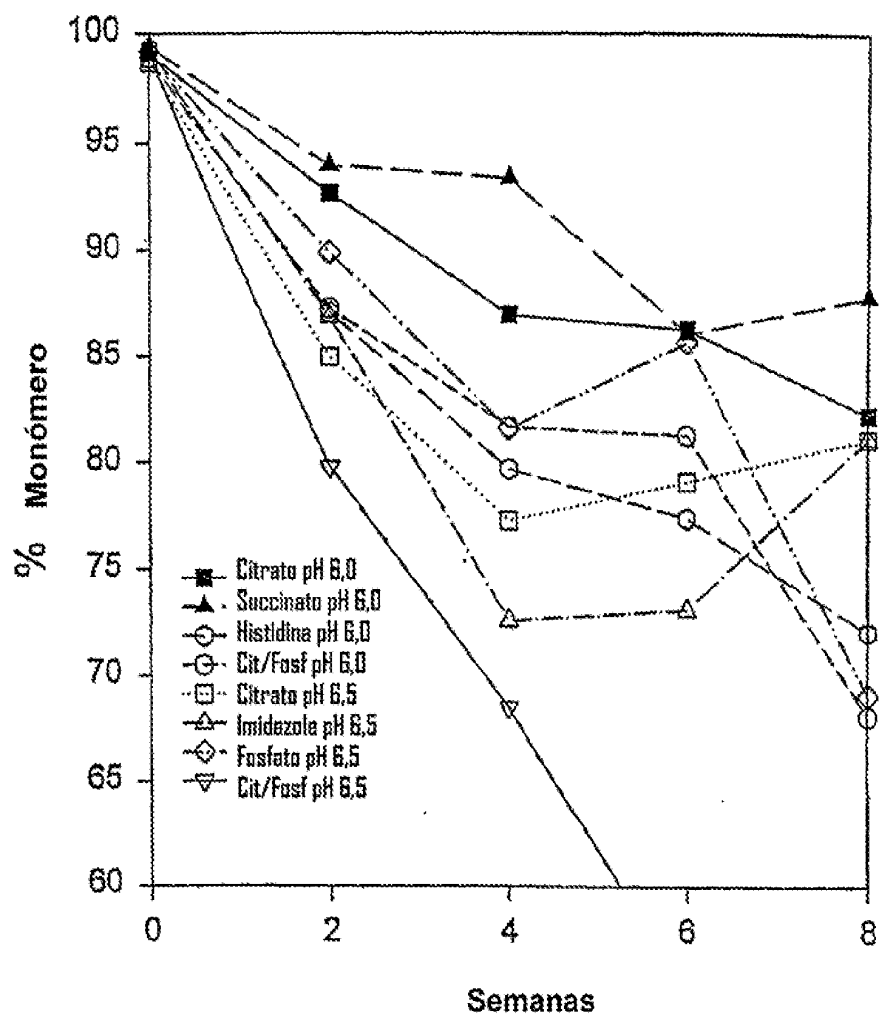
14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que a referida composição é liofilizada.

Lisboa,

FIG. 1.

FIG. 2.

FIG. 3.

FIG. 4.

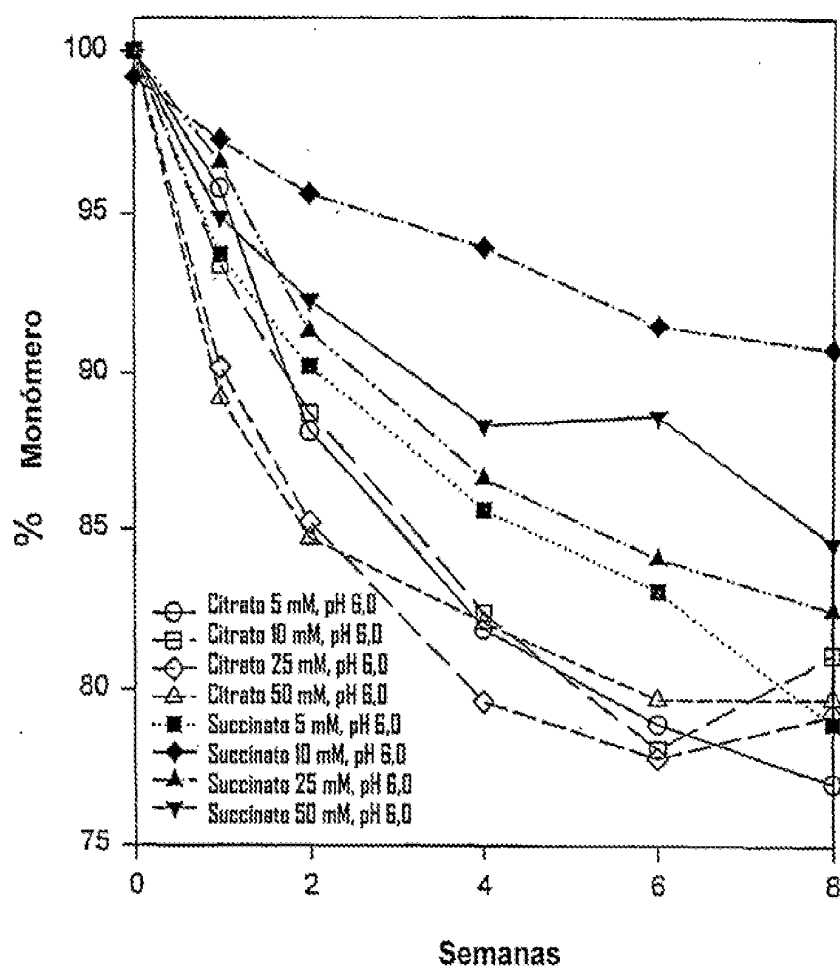


FIG. 5.

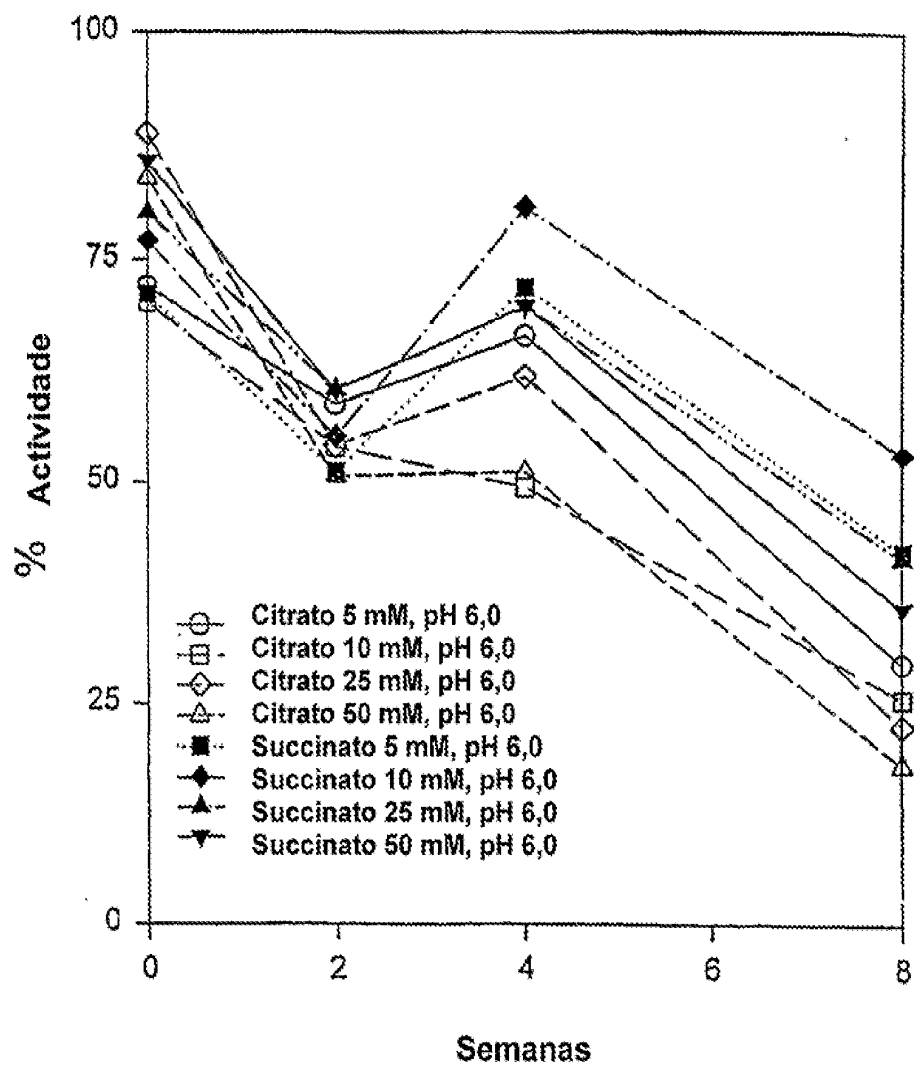
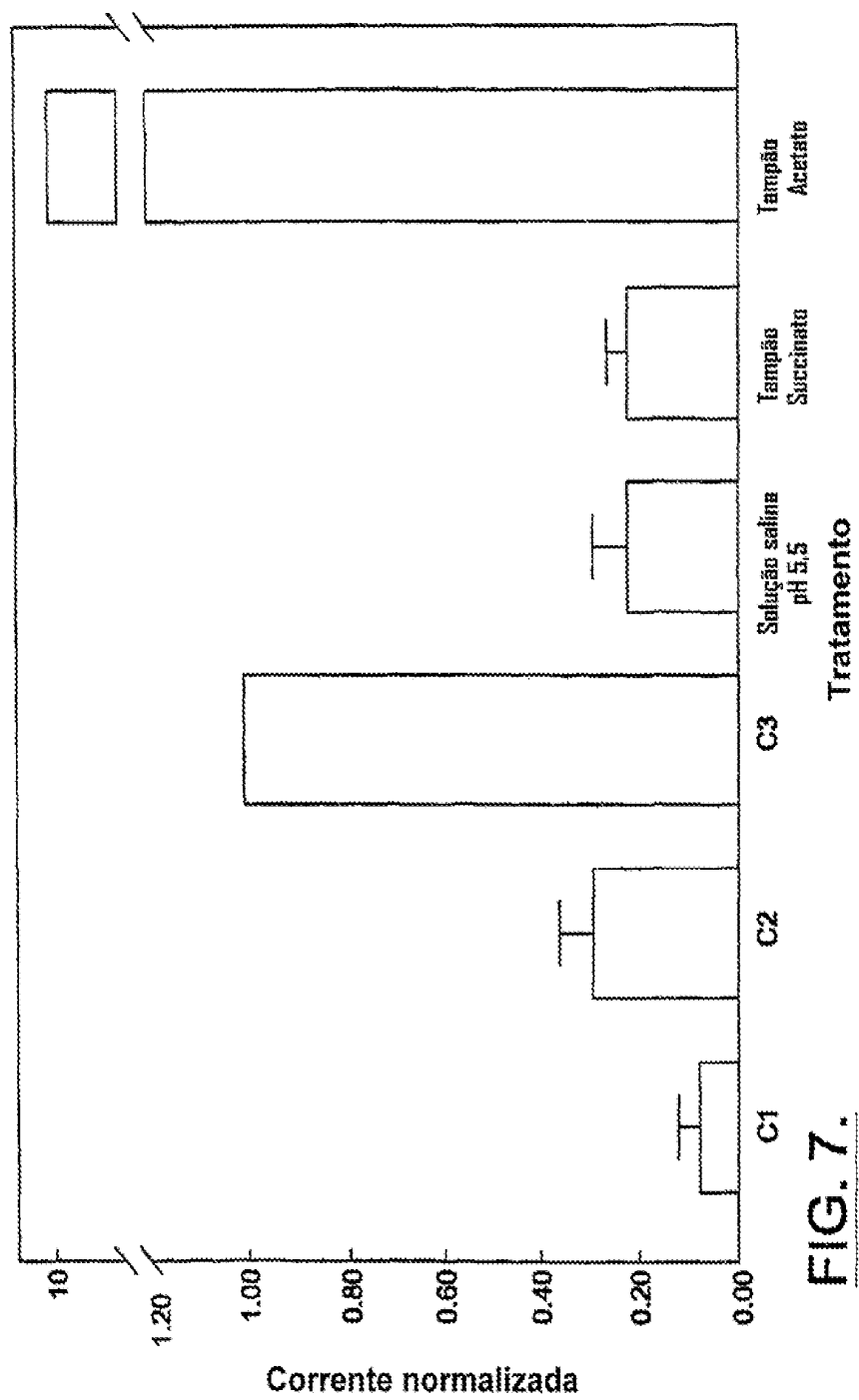


FIG. 6.

**FIG. 7.**

Concepção do Estudo de Grupo com Graus de Inflamação

Grupo*	Designação Suporte de Controlo/Artigo Teste	Ponto 1 (solução salina a 0,9%)		Ponto 2 (suporte de controlo)		Ponto 3 (artigo de teste)	
1	A	mínima	2**	mínima	3	mínima	0
		ligeira	0	ligeira	0	ligeira	3
		moderada	0	moderada	0	moderada	0
		grave	0	grave	0	grave	0
2	B	mínima	2	mínima	2	mínima	0
		ligeira	0	ligeira	0	ligeira	4
		moderada	0	moderada	0	moderada	0
		grave	0	grave	0	grave	0
3	C	mínima	3	mínima	1	mínima	0
		ligeira	1	ligeira	3	ligeira	1
		moderada	0	moderada	0	moderada	3
		grave	0	grave	0	grave	0
4	D	mínima	1	mínima	2	mínima	2
		ligeira	1	ligeira	0	ligeira	0
		moderada	0	moderada	0	moderada	2
		grave	0	grave	0	grave	0
5	E	mínima	1	mínima	2	mínima	0
		ligeira	1	ligeira	0	ligeira	1
		moderada	0	moderada	0	moderada	3
		grave	0	grave	0	grave	0
6	F	mínima	2	mínima	2	mínima	0
		ligeira	0	ligeira	0	ligeira	1
		moderada	0	moderada	0	moderada	3
		grave	1	grave	0	grave	0
* quatro coelhos/grupo							
** número de animais com grau de inflamação, resultado máximo #4							

FIG. 8