



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

(21) **PI0706947-2 A2**

(22) Data de Depósito: 24/01/2007
(43) Data da Publicação: 12/04/2011
(RPI 2101)



(51) Int.Cl.:
A61K 9/16
A61K 38/16
A61K 38/48

(54) Título: **MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO À BASE DE PROTEÍNA, COMPOSIÇÃO E ARTIGO DE MANUFATURA**

(30) Prioridade Unionista: 24/01/2006 US 60/762,002

(73) Titular(es): NEXBIO, INC.,

(72) Inventor(es): FANG FANG, MICHAEL P. MALAKHOV

(74) Procurador(es): David do Nascimento Advogados Associados

(86) Pedido Internacional: PCT US07001914 de 24/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/114881 de 11/10/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO A BASE DE PROTEÍNA, COMPOSIÇÃO E ARTIGO DE MANUFATURA As microesteras São produzidas ao entrar em contato com uma solução aquosa de uma proteína ou de outra macromolécula com um solvente orgânico e um contraion e resfriar a solução. As microesferas são úteis para preparar produtos farmacêuticos de dimensões definidas.



MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO À BASE DE
PROTEÍNA, COMPOSIÇÃO E ARTIGO DE MANUFATURA

PEDIDOS CORRELATOS

O benefício da prioridade é reivindicado pelo
5 Pedido de Patente Provisório Norte-americano N°. 60/762.002,
depositado em 24 de janeiro de 2006, intitulado "Technology
for Preparation of Macromolecular Microspheres". Onde
permitido, este pedido é incorporado a título de referência
em sua totalidade.

10 O presente pedido também é relacionado ao Pedido de
Patente Norte-americano N° de Série 11/657.812 (Documento do
Procurador N°. 21865-004001/6504, depositado em 24 de janeiro
de 2007). Este pedido também é relacionado às Publicações
Norte-americanas N°. US20050004020 A1 e US20050112751 A1.
15 Onde permitido, cada um destes pedidos é incorporado a título
de referência em sua totalidade.

FUNDAMENTOS

A administração de proteínas a animais, incluindo
seres humanos, em suplementos nutritivos ou como terapêutica
20 já é conhecida há algum tempo. As proteínas para a
administração terapêutica ou nutritiva estão geralmente
disponíveis como (1) concentrados ou pós que são
administrados diretamente ou são reconstituídos em um líquido
de escolha antes da utilização; ou como (2) formulações
25 líquidas.

A preparação e a aplicação de proteínas
terapêuticas de interesse na forma de pó ou de partículas são
uma área de atividade de pesquisa e de desenvolvimento
concentrada na indústria farmacêutica. Para a eficácia
30 terapêutica, é desejável ter uma formulação uniforme. Por
exemplo, para a administração pulmonar, a proteína é
preparada idealmente na forma de microesferas distintas, que
são partículas sólidas ou semi-sólidas que têm um diâmetro

entre 0,5 e 5,0 micra. Também é desejável que as partículas tenham um teor de proteína que seja tão elevado quanto possível e que mantenham sua atividade para a aplicação concentrada e a eficácia terapêutica.

5 Os métodos precedentes de produção de micropartículas ou nanopartículas de proteína têm envolvido etapas complexas, tais como a mistura com polímeros orgânicos e/ou a formação de um arranjo de treliça com os polímeros; secagem por aspersão, secagem por aspersão congelada ou técnicas
10 antissolventes fluidas supercríticas que utilizam equipamentos especializados e complexos; ou a liofilização seguida por aspersão ou moagem, que resulta freqüentemente em partículas não-uniformes que devem ser adicionalmente classificadas. Freqüentemente, os métodos precedentes de
15 produção de formulações de proteína sólidas envolvem as etapas de processamento, tais como o aquecimento, que desnatura a proteína e compromete sua atividade. Além disso, alguns métodos não fornecem a recuperação elevada da solução na formulação sólida.

20 Conseqüentemente, há a necessidade de um método para a produção de proteínas e de outras micropartículas macromoleculares que não requer equipamentos especializados ou complexos e que produz micropartículas dimensionadas de modo uniforme para a aplicação. Ainda existe a necessidade de
25 um método para a produção de micropartículas que contenha concentrações de proteínas ou de macromoléculas elevadas relativamente a outros componentes, que sejam estáveis e mantenham sua atividade por períodos de tempo longos quando armazenadas à temperatura ambiente e que não contêm uma
30 quantidade significativa de proteína desnaturada. Há também uma necessidade para um método para a produção de micropartículas das proteínas e outras macromoléculas em que substancialmente tudo da proteína ou de macromoléculas no

material de partida são recuperados na formulação de micropartícula, com a perda mínima. Há também a necessidade de micropartículas de proteínas ou de outras macromoléculas que contêm estas propriedades para a administração, por exemplo, como um suplemento terapêutico ou nutritivo.

DESCRIÇÃO RESUMIDA

São providos na presente invenção os métodos para a produção de proteínas e de outras micropartículas macromoleculares que não requerem equipamentos especializados ou complexos e que produzem micropartículas dimensionadas de modo uniforme para a aplicação; os métodos para a produção de micropartículas que contêm concentrações de proteínas ou de macromoléculas elevadas relativamente a outros componentes, que são estáveis e mantêm sua atividade por períodos de tempo longos quando armazenadas à temperatura ambiente e que não contenham uma quantidade significativa de proteína desnaturada. Também são providos os métodos para a produção de micropartículas de proteínas e de outras macromoléculas onde substancialmente toda a proteína ou macromolécula no material de partida seja recuperada na formulação de micropartículas, com perda mínima. Também são providas as micropartículas de proteínas e de outras macromoléculas que contêm estas propriedades para a administração, por exemplo, como um suplemento terapêutico ou nutritivo.

Os métodos de elaboração de uma composição com base em proteínas, as próprias composições com base em proteínas, combinações e artigos de manufatura providos abaixo são caracterizados por uma variedade de ingredientes componentes, etapas de preparação e parâmetros biofísicos, físicos, bioquímicos e químicos. Conforme ficará evidente a um elemento versado na técnica, as composições e os métodos providos na presente invenção incluem qualquer uma e todas as permutações e combinações de ingredientes, etapas e/ou de

parâmetros descritos abaixo.

São providos na presente invenção os métodos de elaboração de uma composição com base em proteínas. O método provido na presente invenção pode ser utilizado na elaboração de composições de outras macromoléculas além das proteínas, incluindo o DNA, o RNA, o PNA, os lipídeos, os oligossacarídeos e as combinações destes.

Os métodos providos na presente invenção podem incluir as etapas de:

- 10 a) adição de um contraíon a uma solução que contém a proteína em um solvente aquoso;
- b) adição de um solvente orgânico à solução; e
- c) resfriamento gradual da solução a uma temperatura abaixo de aproximadamente 25°C, por meio de que
- 15 uma composição que contém as micropartículas que compreendem a proteína é formada, em que as etapas a), b) e c) são executadas simultaneamente, seqüencialmente, intermitentemente ou em qualquer ordem.

Em uma realização, as etapas a), b) e então c) são

- 20 seqüencialmente executadas. Em uma outra realização, o método de elaboração de uma composição com base em proteínas inclui a execução das etapas a) e b) simultaneamente ou seqüencialmente em qualquer ordem, seguida pela etapa c).

As micropartículas resultantes podem ser obtidas

- 25 por precipitação, separação de fase ou por formação coloidal. Em alguns aspectos, os métodos providos na presente invenção compreendem adicionalmente a separação das micropartículas da solução para remover os componentes à exceção das micropartículas. Esta etapa de separação pode ser executada
- 30 depois da etapa c) acima mencionada. A separação pode ser efetuada, por exemplo, por sedimentação, filtração e/ou secagem por congelamento.

Os métodos providos na presente invenção incluem a

adição de um solvente orgânico a um solvente aquoso que contém a proteína. Em determinadas realizações, o solvente orgânico é miscível ou parcialmente miscível com o solvente aquoso. Em realizações adicionais dos métodos providos na presente invenção, o solvente orgânico é selecionado entre os álcoois alifáticos, álcoois aromáticos, clorofórmio, cloreto de dimetila, álcoois de açúcar poliídricos, hidrocarbonetos aromáticos, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, dioxanos, alcanos, alquenos, dienos conjugados, diclorometano, acetonitrilo, acetato de etila, polióis, poliimidas, poliésteres, polialdeídos e misturas destes. Por exemplo, onde o solvente orgânico é um álcool alifático, o solvente orgânico pode ser isopropanol. A quantidade de solvente orgânico adicionada pode variar nos métodos providos na presente invenção. Por exemplo, a quantidade de solvente orgânico adicionada pode ser de aproximadamente 0,1% ou de 0,1% a aproximadamente 50% ou a 50% em volume/volume. Em outras realizações, a quantidade de solvente orgânico adicionada é de aproximadamente 1% ou de 1% a aproximadamente 30% ou a 30% em volume/volume, de aproximadamente 5% ou de 5% a aproximadamente 30% ou a 30% em volume/volume, de aproximadamente 10% ou de 10% a aproximadamente 30% ou a 30% em volume/volume ou de aproximadamente 15% ou de 15% a aproximadamente 20% ou de 20% em volume/volume.

O contraíon utilizado nos métodos providos na presente invenção pode ser um composto aniônico, um composto catiônico e/ou um composto dipolar. Por exemplo, quando o contraíon é um composto aniônico, o contraíon pode ser glicina, citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de zinco, sulfato de magnésio, sulfato de potássio ou sulfato de cálcio. A concentração de solvente orgânico adicionada à solução pode variar nos métodos providos na presente invenção. Por exemplo, a concentração de contraíon adicionada

à solução pode ser de aproximadamente 0,1 mM ou de 0,1 mM a aproximadamente 100 mM ou de 100 mM. Em outras realizações, a concentração de contraíon adicionada à solução é de aproximadamente 0,2 mM ou de 0,2 mM a aproximadamente 50 mM
5 ou de 50 mM, de aproximadamente 0,3 mM ou de 0,3 mM a aproximadamente 30 mM ou de 30 mM, de aproximadamente 0,5 mM ou de 0,5 mM a aproximadamente 20 mM ou de 20 mM ou de aproximadamente 1 mM ou de 1 mM a aproximadamente 10 mM ou de 10 mM. Em uma realização particular, a concentração de
10 contraíon adicionada à solução é aproximadamente 5 mM ou 5 mM.

Em um aspecto dos métodos providos na presente invenção, o pH da solução que contém a proteína está em ou abaixo do pH da proteína. Em alguns aspectos, o pH da solução
15 é de aproximadamente 4,0 ou de 4,0 a aproximadamente 9,0 ou de 9,0. Em outros aspectos, o pH da solução é de aproximadamente 4,5 ou de 4,5 a aproximadamente 8,0 ou de 8,0, de aproximadamente 4,5 ou de 4,5 a aproximadamente 6,5 ou de 6,5 ou de aproximadamente 4,5 ou de 4,5 a
20 aproximadamente 5,5 ou de 5,5.

A proteína que é utilizada nos métodos providos na presente invenção para a elaboração de uma composição com base em proteínas pode ser selecionada entre as sialidases, proteínas de fusão de sialidase, proteases, inibidores de
25 protease, citocinas, insulina, hormônio humano do crescimento, calcitonina, DNase humano recombinante, interferons e hormônio paratireóide. Em uma realização, onde a proteína é um inibidor de protease, a proteína é o inibidor de protease humano 8 (PI8). Em uma outra realização, a
30 proteína é uma proteína de fusão de sialidase. Em alguns aspectos onde a proteína é uma proteína de fusão de sialidase, a proteína de fusão de sialidase contém um domínio catalítico de uma sialidase e um domínio de ancoragem, em que

o domínio catalítico de sialidase é a única porção de sialidase na proteína de fusão de sialidase. A sialidase pode ser, por exemplo, uma sialidase de *Actinomyces viscosus*, uma sialidase de *Clostridium perfringens*, uma sialidase de
5 *Arthrobacter ureafaciens*, uma sialidase de *Micromonospora viridifaciens*, uma sialidase Neu2 humana ou uma sialidase Neu4 humana.

Em um aspecto, onde a sialidase é uma sialidase de *Actinomyces viscosus*, a sequência de aminoácido do domínio
10 catalítico contém a sequência dos resíduos de aminoácido que começam em qualquer um dos aminoácidos do aminoácido 270 ao aminoácido 290 e que terminam em qualquer um dos aminoácidos do aminoácido 665 ao aminoácido 901 da sequência de aminoácido determinada na SEQ ID N°.: 1. Por exemplo, em uma
15 realização, a sequência do domínio catalítico de sialidase contém a sequência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°.: 2. Em uma outra realização, a sequência do domínio catalítico compreende a sequência dos resíduos de aminoácido que começam no aminoácido 274 e que terminam no
20 aminoácido 681 da sequência de aminoácido determinada na SEQ ID N°.: 1. Em uma realização diferente, a sequência do domínio catalítico compreende a sequência dos resíduos de aminoácido que começam no aminoácido 274 e que terminam no aminoácido 666 da sequência de aminoácido determinada na SEQ
25 ID N°.: 1. Em uma outra realização, a sequência do domínio catalítico compreende a sequência de aminoácido que começa no aminoácido 290 e que terminam no aminoácido 681 da sequência de aminoácido determinada na SEQ ID N°.: 1.

Em um aspecto, onde a proteína que é utilizada nos
30 métodos providos na presente invenção para a elaboração de uma composição com base em proteínas é uma proteína de fusão de sialidase que contém um domínio de ancoragem, o domínio de ancoragem é um domínio de ligação de glicosaminoglicano

(GAG). Em um aspecto adicional, o domínio de ligação de GAG é selecionado entre o domínio de ligação de GAG do fator de plaquetas humano 4, domínio de ligação de GAG de interleucina humana 8, domínio de ligação de GAG de antitrombina humana III, domínio de ligação de GAG de apoproteína humana E, domínio de ligação de GAG da proteína migratória angio-associada humana e domínio de ligação de GAG de anfirregulina humana. Em realizações particulares, a seqüência de aminoácido do domínio de ligação de GAG contém a seqüência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°.: 3, na SEQ ID N°.: 4, na SEQ ID N°.: 5, na SEQ ID N°.: 6, na SEQ ID N°.: 7 ou na SEQ ID N°.: 8.

Em alguns aspectos onde a proteína que é utilizada nos métodos providos na presente invenção para a elaboração de uma composição com base em proteínas é uma proteína de fusão de sialidase, a seqüência de aminoácido da proteína de fusão de sialidase contém a seqüência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°.: 9, a seqüência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°.: 10, a seqüência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°.: 11, a seqüência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°.: 12, a seqüência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°.: 13, a seqüência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°.: 14 ou a seqüência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°.: 17.

Em um aspecto, a quantidade de proteína nas micropartículas produzidas pelos métodos providos na presente invenção, relativamente à quantidade total de proteína na solução da etapa a) é de aproximadamente 80% ou de 80% a mais do que aproximadamente 99% ou de 99%. Em um outro aspecto, a composição de micropartículas resultante produzida pelos métodos providos na presente invenção pode adicionalmente compreender agentes de revestimento resistentes a ácido,

agentes de revestimento resistentes a protease, agentes de revestimento entéricos, agentes de avolumação, excipientes, ingredientes inativos, intensificadores de estabilidade, modificadores de sabor e/ou de odor ou agentes de mascaração, 5 vitaminas, agentes terapêuticos, antioxidantes, imunomoduladores, modificadores do transporte de transmembrana, agentes anti formação de torta, quitosanas ou intensificadores da capacidade de fluxo.

A solução e/ou a composição resultante dos métodos 10 providos na presente invenção podem, em um aspecto, compreender adicionalmente um agente ativo. Em algumas realizações, o agente ativo é selecionado entre antidiabéticos, anticonvulsivantes, analgésicos, antiparkinsonianos, antiinflamatórios, antagonistas de 15 cálcio, anestésicos, antimicrobianos, antimaláricos, antiparasíticos, anti-hipertensivos, anti-histamínicos, antipiréticos, agonistas alfa-adrenérgicos, alfa-bloqueadores, biocidas, bactericidas, dilatadores brônquicos, drogas de obstrução beta-adrenérgicas, contraceptivos, drogas 20 cardiovasculares, inibidores do canal de cálcio, antidepressivos, agentes de diagnóstico, diuréticos, eletrólitos, enzimas, hipnóticos, hormônios, hipoglicêmicos, hiperglicêmicos, constritores musculares, relaxantes musculares, neoplásticos, glicoproteínas, nucleoproteínas, 25 lipoproteínas, oftálmicos, energizantes psíquicos, sedativos, esteróides, simpatomiméticos, parassimpatomiméticos, tranqüilizantes, drogas do trato urinário, vacinas, drogas vaginais, vitaminas, sais minerais, drogas antiinflamatórias não-esteroidais, enzimas de conversão de angiotensina, 30 polinucleotídeos, polipeptídeos e polissacarídeos. Em uma outra realização, o agente ativo é um suplemento nutritivo.

Os métodos providos na presente invenção envolvem a resfriamento gradual da solução a uma temperatura abaixo de

aproximadamente 25°C. Em uma realização, a temperatura está entre aproximadamente 4°C a aproximadamente -45°C. Em uma outra realização, a temperatura está entre aproximadamente 2°C a aproximadamente -20°C. Em uma realização adicional, a temperatura está entre aproximadamente 2°C a aproximadamente -15°C. Em uma outra realização, a temperatura está entre aproximadamente 0°C ou de 0°C a aproximadamente -2°C ou de -2°C a aproximadamente -15°C ou de -15°C a aproximadamente -20°C ou de -20°C. A resfriamento gradual pode ser executada em uma variedade de taxas. Por exemplo, a resfriamento pode ser efetuada em uma taxa de aproximadamente 0,01°C/min ou de 0,01°C/min a aproximadamente 20°C/min ou de 20°C/min. Em outras realizações, a resfriamento gradual está em uma taxa de aproximadamente 0,05°C/min ou de aproximadamente 0,1°C/min a aproximadamente ou de 10°C/min ou de aproximadamente 15°C/min, de aproximadamente ou a 0,2°C/min a aproximadamente ou a 5°C/min ou de aproximadamente 0,5°C/min a aproximadamente ou a 2°C/min. Em uma realização particular, a resfriamento gradual é executada em uma taxa de aproximadamente ou em 1°C/min.

Em um aspecto, o tamanho das micropartículas produzidas pelos métodos providos na presente invenção é de aproximadamente 0,001 μm ou de 0,001 μm a aproximadamente 50 μm ou de 50 μm . Em outras realizações, o tamanho das micropartículas é de aproximadamente 0,3 μm ou de 0,3 μm a aproximadamente 30 μm ou de 30 μm , de aproximadamente 0,5 μm ou de 0,5 μm a aproximadamente 10 μm ou de 10 μm , de aproximadamente 0,5 μm ou de 0,5 μm a aproximadamente 5,0 μm ou de 5,0 μm , de aproximadamente 1,0 μm ou de 1,0 μm a aproximadamente 5,0 μm ou de 5,0 μm ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0, 3,0, 4,0 ou 5,0 μm .

Em alguns aspectos dos métodos providos na presente invenção, a composição com base em proteínas resultante tem

uma vida útil de aproximadamente uma semana a aproximadamente um mês, de aproximadamente um mês a aproximadamente seis meses, de aproximadamente seis meses a aproximadamente um ano, de aproximadamente um ano a aproximadamente dois anos ou
5 de aproximadamente dois anos a aproximadamente cinco anos a uma temperatura de aproximadamente 55°C, 50°C, 45°C, 44°C, 42°C, 40°C, 39°C, 38°C, 37°C ou abaixo de 54°C. Em um outro aspecto, o teor de umidade das micropartículas é ajustado de modo que pelo menos aproximadamente 90% da atividade da
10 proteína fique retido após a armazenagem por aproximadamente seis meses a aproximadamente um ano a uma temperatura de aproximadamente 25°C. Em um outro aspecto, o teor de umidade das micropartículas é ajustado de modo que pelo menos aproximadamente 90% das micropartículas não fiquem agregadas
15 após a armazenagem por aproximadamente seis meses a aproximadamente um ano a uma temperatura de aproximadamente 25°C.

Em um determinado aspecto dos métodos providos na presente invenção, a proteína é uma proteína de fusão que
20 contém um domínio catalítico de sialidase e um domínio de ancoragem, em que o domínio catalítico de sialidase é a única porção de sialidase na proteína de fusão, o solvente orgânico é adicionado em uma quantidade de aproximadamente 5% ou de 5% a aproximadamente 20% ou de 20% em volume/volume, o contraíon
25 é adicionado em uma quantidade de aproximadamente 1 mM ou de 1 mM a aproximadamente 5 mM ou de 5 mM e o pH da solução é ajustado de aproximadamente 4,5 ou de 4,5 a aproximadamente 5,5 ou 5,5. Em uma realização deste aspecto, o domínio catalítico de sialidase é de *Actinomyces viscosus* e o domínio
30 de ancoragem é o domínio de ligação de GAG de anfirregulina humana. Além disso, o pH é de aproximadamente 5,0 e/ou o contraíon é selecionado entre glicina, citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de zinco, sulfato de magnésio,

sulfato de potássio ou sulfato de cálcio. Em uma outra realização deste aspecto, o solvente orgânico é isopropanol. Em uma realização deste aspecto, a composição resultante contém as micropartículas que contêm a proteína como o único
5 ingrediente ativo (isto é, consiste essencialmente em). Em uma outra realização, o método inclui a separação das micropartículas da solução para remover os componentes à exceção das micropartículas, como por sedimentação, filtração e/ou secagem por congelamento. Em algumas realizações deste
10 aspecto, o teor de umidade das micropartículas é de aproximadamente 6% a aproximadamente 12% ou de aproximadamente 7% a aproximadamente 10,5%.

São providas na presente invenção as composições que contêm micropartículas de uma sialidase ou de uma
15 proteína de fusão de sialidase. Onde a proteína é uma proteína de fusão de sialidase, a proteína de fusão de sialidase pode compreender um domínio catalítico de uma sialidase e um domínio de ancoragem. Em alguns aspectos, a sialidase na composição é uma sialidase de *Actinomyces*
20 *viscosus*, uma sialidase de *Clostridium perfringens*, uma sialidase de *Arthrobacter ureafaciens*, uma sialidase de *Micromonospora viridifaciens*, uma sialidase Neu2 humana ou uma sialidase Neu4 humana.

Em um aspecto, onde a sialidase da composição é uma
25 sialidase de *Actinomyces viscosus*, a sequência de aminoácido do domínio catalítico compreende a sequência de aminoácido que começa em qualquer um dos resíduos de aminoácido do aminoácido 270 ao aminoácido 290 e que termina em qualquer um dos resíduos de aminoácido do aminoácido 665 ao aminoácido
30 901 da sequência de aminoácido determinada na SEQ ID N°. 1. Por exemplo, a sequência do domínio catalítico pode compreender a sequência de aminoácido que começa no aminoácido 274 e que termina no aminoácido 681 da sequência

de aminoácido determinada na SEQ ID N°.: 1, a seqüência de aminoácido que começa no aminoácido 290 e que termina no aminoácido 666 da seqüência de aminoácido determinada na SEQ ID N°.: 1 ou da seqüência de aminoácido que começa no aminoácido 290 e que termina no aminoácido 681 da seqüência de aminoácido determinada na SEQ ID N°.: 1. Em uma outra realização, a seqüência do domínio catalítico de sialidase compreende a seqüência de aminoácido determinada na SEQ ID N°.: 2.

Em um aspecto, onde a composição compreende micropartículas de uma proteína de fusão de sialidase, o domínio de ancoragem da proteína de fusão de sialidase é um domínio de ligação de glicosaminoglicano (GAG). Em um aspecto adicional, o domínio de ligação de GAG é selecionado entre o domínio de ligação de GAG do fator de plaquetas humano 4, domínio de ligação de GAG de interleucina humana 8, domínio de ligação de GAG de antitrombina humana III, domínio de ligação de GAG de apoproteína humano E, domínio de ligação de GAG da proteína migratória angio-associada humana e domínio de ligação de GAG de anfirregulina humana. Em realizações particulares, a seqüência de aminoácido do domínio de ligação de GAG contém a seqüência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°.: 3, na SEQ ID N°.: 4, na SEQ ID N°.: 5, na SEQ ID N°.: 6, na SEQ ID N°.: 7 ou na SEQ ID N°.: 8.

As proteínas de fusão de sialidase das composições providas na presente invenção podem conter, por exemplo, a seqüência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°.: 9, na SEQ ID N°.: 10, na SEQ ID N°.: 11, na SEQ ID N°.: 12, na SEQ ID N°.: 13, na SEQ ID N°.: 14 ou na SEQ ID N°.: 17.

A quantidade de proteína nas micropartículas das composições providas na presente invenção pode variar. Por

exemplo, a quantidade de proteína nas micropartículas pode ser de aproximadamente 60% a mais do que aproximadamente 99% em peso/peso. Em uma realização, a quantidade de proteína nas micropartículas é de aproximadamente 65% a aproximadamente 90% em peso/peso. Em uma outra realização, a quantidade de proteína nas micropartículas é de aproximadamente 70% a aproximadamente 85%, 86%, 87%, 88%, 89% ou 90% em peso/peso. A quantidade de proteína nas micropartículas das composições providas na presente invenção também pode ser de aproximadamente 90% a aproximadamente 99% em peso/peso.

As micropartículas nas composições providas na presente invenção podem conter adicionalmente agentes de revestimento resistentes a ácido, agentes de revestimento resistentes a protease, agentes de revestimento entéricos, agentes de avolumação, excipientes, ingredientes inativos, intensificadores de estabilidade, modificadores de sabor e/ou de odor ou agentes de mascaração, vitaminas, agentes terapêuticos, antioxidantes, imunomoduladores, modificadores do transporte de transmembrana, agentes anti-formação de torta, quitosanas ou intensificadores da capacidade de fluxo.

Em um aspecto, as composições providas na presente invenção podem conter adicionalmente um agente ativo. O agente ativo pode ser um suplemento nutritivo, antidiabéticos, anticonvulsivantes, analgésicos, antiparkinsonianos, anti-inflamatórios, antagonistas de cálcio, anestésicos, antimicrobianos, antimaláricos, antiparasíticos, anti-hipertensivos, anti-histamínicos, antipiréticos, agonistas alfa-adrenérgico, alfa-bloqueadores, biocidas, bactericidas, dilatadores brônquicos, drogas de obstrução beta-adrenérgicas, contraceptivos, drogas cardiovasculares, inibidores do canal de cálcio, antidepressivos, agentes de diagnóstico, diuréticos, eletrólitos, enzimas, hipnóticos, hormônios, hipoglicêmicos,

hiperglicêmicos, constritores musculares, relaxantes musculares, neoplásticos, glicoproteínas, nucleoproteínas, lipoproteínas, oftálmicos, energizantes psíquicos, sedativos, esteróides, simpatomiméticos, parassimpatomiméticos, 5 tranqüilizantes, drogas do trato urinário, vacinas, drogas vaginal, vitaminas, minerais, drogas antiinflamatórias não-esteroidais, enzimas de angiotensina, polinucleotídeos, polipeptídeos e polissacarídeos.

As composições providas na presente invenção podem 10 ter uma vida em armazenagem de comprimento variável. Em um aspecto, a vida útil é de aproximadamente uma semana a aproximadamente um mês, de aproximadamente um mês a aproximadamente seis meses, de aproximadamente seis meses a aproximadamente um ano, de aproximadamente um ano a 15 aproximadamente dois anos ou de aproximadamente dois anos a aproximadamente cinco anos a uma temperatura de aproximadamente 55°C, 50°C, 45°C, 44°C, 42°C, 40°C, 39°C, 38°C, 37°C ou inferior. Em um determinado aspecto, o teor de umidade das micropartículas é ajustado de modo que pelo menos 20 aproximadamente 90% da atividade da proteína fique retido após a armazenagem por aproximadamente seis meses a aproximadamente um ano a uma temperatura de aproximadamente 25°C.

As micropartículas nas composições providas na 25 presente invenção podem conter adicionalmente um contraíon, como, por exemplo, um ânion, um cátion ou um íon dipolar. Em determinadas realizações, o contraíon é selecionado entre glicina, citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de zinco, sulfato de magnésio, sulfato de potássio ou sulfato de 30 cálcio. A quantidade de contraíon em uma micropartícula pode ser variada. Por exemplo, a quantidade de contraíon nas micropartículas pode ser de aproximadamente 0,5% ou de 0,5% a aproximadamente 5% ou de 5% em peso/peso, de aproximadamente

0,5% ou de 0,5% a aproximadamente 2% ou de 2% em peso/peso ou de aproximadamente 1% ou de 1% a aproximadamente 2% ou de 2% em peso/peso.

Em algumas realizações, o teor de umidade das micropartículas nas composições providas na presente invenção é de aproximadamente 6% ou de 6% a aproximadamente 12% ou de 12% ou de aproximadamente 7% ou de 7% a aproximadamente 10,5% ou de 10,5%.

As composições providas na presente invenção podem ser formuladas para uma variedade de modos de administração. Por exemplo, as composições podem ser administradas oralmente, por exemplo, por ingestão, intravenosamente, intranasalmente, parenteralmente, subcutaneamente ou intramuscularmente. As composições também podem ser formuladas para a administração pulmonar ou oftálmica. Em um determinado aspecto, a composição provida na presente invenção é para inalação.

As composições providas na presente invenção podem ser formuladas como tabletes, caplets, géis, frascos, seringas preenchidas, inaladores, dispositivos eletrostáticos e outros dispositivos para a aplicação. A dosagem da aplicação das composições pode ser entre aproximadamente 0,5 mg de proteína por dose a aproximadamente 100 mg de proteína por dose ou de aproximadamente 0,75 mg, 1 mg, 1,5 mg, 2 mg, 3 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg ou 60 mg de proteína por dose. A frequência de administração de uma dose, por exemplo, para o tratamento ou a profilaxia do influenza, pode ser de três ou mais vezes ao dia, a duas vezes ao dia, uma vez ao dia, a duas vezes por semana, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas ou menos freqüente do que uma vez a cada duas semanas. Para a profilaxia, a administração pode ser geralmente da ordem de aproximadamente uma vez a cada duas semanas ou menos

freqüente, como uma vez a cada três semanas ou uma vez a cada quatro semanas ou por mais tempo.

O tamanho das micropartículas nas composições providas na presente invenção pode variar. Por exemplo, o tamanho das micropartículas pode ser de aproximadamente 0,001 μm ou de 0,001 μm a aproximadamente 50 μm ou 50 μm . Em determinadas realizações, o tamanho das micropartículas é de aproximadamente 0,3 μm ou de 0,3 μm a aproximadamente 30 μm ou de 30 μm , de aproximadamente 0,5 μm ou de 0,5 μm a aproximadamente 10 μm ou de 10 μm , de aproximadamente 0,5 μm ou de 0,5 μm a aproximadamente 5,0 μm ou de 5,0 μm , de aproximadamente 1,0 μm ou de 1,0 μm a aproximadamente 5,0 μm ou de 5,0 μm ou de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0, 3,0, 4,0 ou 5,0 μm .

Também são providos na presente invenção os artigos de manufatura que contêm uma composição que contém micropartículas de uma sialidase ou de uma proteína de fusão de sialidase, um material de acondicionamento para a composição e uma etiqueta que indica que a composição é para uma indicação terapêutica. Em uma realização, a indicação terapêutica é o influenza. O artigo de manufatura também pode conter um inalador para a administração pulmonar da composição. Em determinadas realizações, o inalador é um inalador em pó seco, um inalador com medidor de dose ou um dispositivo de aplicação eletrostático.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A. Definições

A menos que definidos de outra maneira, todos os termos técnicos e científicos utilizados na presente invenção têm o mesmo significado que é compreendido geralmente por um elemento versado na técnica à qual a(s) invenção(ões) pertence(m). Todas as patentes, pedidos de patente, publicações e pedidos publicados, seqüências no Genbank,

sites na Web e outros materiais publicados referidos nesta descrição inteira, a menos que observado de outra maneira, são incorporados a título de referência em sua totalidade. Caso haja uma pluralidade de definições para termos na presente invenção, aqueles nesta seção prevalecem. Onde a referência é feita a um URL ou outro identificador ou endereço, fica compreendido que tais identificadores podem mudar e as informações particulares na Internet podem vir e ir, mas as informações equivalentes podem ser encontradas pela busca na Internet. A referência evidencia a disponibilidade e a disseminação pública de tais informações.

Conforme utilizado na presente invenção, o termo "macromolécula" é utilizado para significar uma molécula composta de duas ou mais subunidades monoméricas ou derivados destas, que são ligadas por uma ligação ou qualquer macromolécula que possa formar uma estrutura terciária. Uma macromolécula pode ser, por exemplo, um polinucleotídeo, um ácido nucléico, moléculas incluindo o DNA, o RNA e o ácido nucléico do peptídeo (PNA), um polipeptídeo, uma proteína, um carboidrato ou um lipídeo ou derivados ou combinações destes, por exemplo, uma molécula de ácido nucléico que contém uma porção de ácido nucléico do peptídeo ou uma glicoproteína, respectivamente. Os métodos, as composições, as combinações, os kits e os artigos de manufatura providos na presente invenção, embora descritos com referência às proteínas, podem ser adaptados para a utilização com outras macromoléculas, tal como definido e provido na presente invenção.

O termo "substancialmente" ou "substancial" conforme utilizado na presente invenção significa geralmente pelo menos aproximadamente 60% ou 60%, aproximadamente 70% ou 70% ou aproximadamente ou em 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais relativamente a uma referência tal como, por exemplo, uma seqüência de ácido nucléico ou de

proteína ou a composição original de uma entidade. Desse modo, uma composição que contém micropartículas separadas de "substancialmente" todos contaminadores restantes e/ou ingredientes incluindo contraíons, sais e solventes da solução de coquetel significam que pelo menos aproximadamente 60% ou 60%, aproximadamente 70% ou 70% ou de aproximadamente ou em 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou quantidades mais elevadas de contaminadores e/ou de reagentes foram removidas da solução de coquetel em que as micropartículas são formadas. O termo "substancialmente idêntico" ou "substancialmente homólogo" ou similar varia com o contexto, tal como compreendido pelos elementos versados na técnica relevante e significa geralmente pelo menos aproximadamente 60% ou 60%, aproximadamente 70% ou 70% ou de aproximadamente ou em 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou em uma identidade mais elevada.

O termo "consiste essencialmente em" ou "que consiste essencialmente em" como utilizado na presente invenção refere-se a uma entidade a partir da qual substancialmente todos os componentes/ingredientes restantes que não são associados com a entidade ou suas propriedades foram removidos ou separados da entidade. Desse modo, uma composição "que consiste essencialmente em" micropartículas significa que todos ingredientes restantes tais como contaminadores e solventes foram removidos substancialmente da solução/suspensão que contém as micropartículas.

O termo "micropartícula" como utilizado na presente invenção é permutável com "microesfera" e refere-se às partículas na faixa de tamanho (comprimento, largura ou diâmetro médio) de aproximadamente ou em 0,001 micron (μm) a aproximadamente ou em 500 micras que contém uma macromolécula e aplicam um agente de interesse, tal como uma droga ou um suplemento nutritivo, a um indivíduo. O agente

pode ser a macromolécula, por exemplo, uma proteína, um ácido nucléico, um lipídeo ou um polissacarídeo ou a macromolécula que forma a micropartícula pode ser um portador para o agente ativo, tal como uma droga ou um suplemento nutritivo. As micropartículas também podem conter macromoléculas sintéticas incluindo polímeros, tais como o polietilenoglicol (PEG), o ácido poliláctico (PLA), o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) e polímeros naturais tais como albumina, gelatina, quitosana e dextrano. As "micropartículas" como descritas na presente invenção podem conter e podem ser feitas de uma macromolécula natural ou sintética particular sozinha ou de mais de um tipo da mesma macromolécula natural ou sintética (por exemplo, mais de um tipo de proteína) ou de combinações de mais de um tipo diferente de macromolécula natural ou sintética (por exemplo, uma proteína e um ácido nucléico ou uma proteína e um polímero sintético).

O termo "micropartícula" como utilizado na presente invenção também se refere geralmente a uma partícula que não seja uma forma sólida da solução inteira da qual é produzida, embora as partículas congeladas e/ou secas de uma solução que contém macromoléculas também sejam contempladas na presente invenção. Em vez disso, a micropartícula como utilizada na presente invenção é geralmente um conjunto de uma fração de componentes de uma solução, incluindo sais, contraíons, solventes e outros ingredientes, que é formado por um processo que inclui, mas não se limita à precipitação, sedimentação, separação de fase e formação de colóide.

O termo "precipitação" como utilizado na presente invenção refere-se a um processo por meio de que um soluto ou os solutos de interesse em uma solução, tais como os componentes de uma micropartícula, não permanecem mais na solução e formam uma fase que é distinta do solvente ou dos solventes que foram utilizados para a formação da solução. A

precipitação de uma micropartícula e o controle do tamanho da micropartícula precipitada podem ser realizados por uma variedade de meios incluindo, mas não se limitando a ajuste da temperatura, resistência iônica, pH, constante dielétrica, 5 concentração de contraíons, concentração de solvente orgânico, adição de polieletrólitos ou de polímeros, tensoativos, detergentes ou uma combinação destes.

O termo "separação de fase" como utilizado na presente invenção refere-se à transformação de uma única fase 10 homogênea, tal como uma solução, em duas ou mais fases, tais como uma suspensão de uma partícula sólida em um solvente ou em uma solução.

O termo "sedimentação" como utilizado na presente invenção refere-se ao movimento das partículas, tais como as 15 micropartículas, que estão em uma suspensão em um líquido ou que são formadas em uma solução em resposta a uma força externa tal como a gravidade, a força centrífuga ou a força elétrica.

O termo "solução" é utilizado permutavelmente com 20 "solução de coquetel" na presente invenção e refere-se a uma mistura homogênea de dois ou mais ingredientes em uma fase monofásica, sólida, líquida ou gasosa, onde os ingredientes distintos somente são reconhecíveis em nível molecular. A solução pode ser um líquido em que um ou os mais solutos, 25 tais como os sais, são dissolvidos em um solvente, tal como a água ou o álcool ou são dissolvidos em uma mistura de solventes miscíveis, tais como uma mistura de água e de álcool etílico. A solução também pode ser uma forma congelada de uma solução líquida.

30 O termo "miscível" como utilizado na presente invenção refere-se à capacidade de um ou mais componentes, tais como líquidos, sólidos e gases, de se misturar para formar uma única fase homogênea. Desse modo, dois líquidos

são miscíveis se puderem ser misturados para formar um único líquido homogêneo cujos componentes distintos sejam reconhecidos somente em nível molecular. Quando os componentes são "parcialmente miscíveis", significa que podem ser misturados para formar uma única fase homogênea em alguma faixa de concentração, mas não em outras faixas de concentração. Conforme utilizado na presente invenção, quando um solvente é "parcialmente miscível" com um outro solvente, significa que é miscível a uma concentração de aproximadamente ou a 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% ou inferior em volume/volume (v/v), quando misturado com o outro solvente.

Conforme utilizado na presente invenção, "imiscível" significa que quando dois ou mais componentes, tais como líquidos, sólidos ou gases são misturados, eles formam mais de uma fase. Por exemplo, quando um solvente orgânico é imiscível com um solvente aquoso (por exemplo, hexano e água), o solvente orgânico é visível como uma camada distinta que não se mistura com a camada de solvente aquoso.

Conforme utilizado na presente invenção, o termo "polipeptídeo" significa pelo menos dois aminoácidos ou derivados de aminoácido, incluindo os aminoácidos com a massa modificada e análogos de aminoácido, que são ligados por uma ligação de peptídeo, a qual pode ser uma ligação de peptídeo modificada. Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são utilizados essencialmente sinonimamente na presente invenção, embora o elemento versado na técnica reconheça que os peptídeos contêm geralmente menos do que aproximadamente cinquenta a aproximadamente cem resíduos de aminoácido e que as proteínas freqüentemente são obtidas de uma fonte natural e podem conter, por exemplo, modificações pós-translacionais.

Um polipeptídeo ou uma proteína pode ser traduzida a partir de um polinucleotídeo, que pode incluir pelo menos

uma porção de uma seqüência de codificação ou de uma porção de uma seqüência de nucleotídeo que não é naturalmente traduzida devido ao fato de, por exemplo, estar localizada em uma estrutura de leitura diferente de uma estrutura de
 5 codificação, ou ao fato de ser uma seqüência de íntron, uma seqüência não-traduzida 3' ou 5', uma seqüência regulatória tal como um promotor ou outros ainda. Um polipeptídeo também pode ser quimicamente sintetizado e pode ser modificado por métodos químicos ou enzimáticos depois da síntese de tradução
 10 ou química. Um polipeptídeo pode ser modificado pós-translacionalmente por meio de fosforilação (fosfoproteínas), glicosilação (glicoproteínas, proteoglicanos) e outros ainda, que podem ser executadas em uma célula ou em uma reação in vitro.

15 Conforme utilizado na presente invenção, o termo "proteína de fusão" refere-se a uma proteína que é um conjugado de domínios obtidos de mais de uma proteína ou polipeptídeo. Um domínio pode ser um Tag do polipeptídeo, tal como um Tag de His₆. Os conjugados podem ser preparados ao
 20 ligar os domínios por meio de conjugação química, tecnologia de DNA recombinante ou pelas combinações da expressão recombinante e da conjugação química.

Uma variedade de ligantes químicos é conhecida pelos elementos versados na técnica e inclui, mas não é
 25 limitada a enlaces de aminoácido e de peptídeo, tipicamente contendo entre um e aproximadamente 60 aminoácidos, mais geralmente entre aproximadamente 10 e 30 aminoácidos, reticuladores divisíveis heterobifuncionais, incluindo mas não se limitando a N-succinimidil (4-iodoacetil)-
 30 aminobenzoato, sulfosuccinimidil (4-iodoacetil)-aminobenzoato, 4-succinimidil-oxicarbonil-(2-piridilditio)tolueno, hexanoato de sulfosuccinimidil-6-[α -metil- α -(piridilditio)toluamido], hexanoato de N-

succinimidil-3-(-2-piridilditio)-propionato, succinimidil
 6[3(-(-2-piridilditio)-propionamido], hexanoato de
 sulfosuccinimidil 6[3(-(-2-piridilditio)-propionamido],
 hidrazida de 3-(2-piridilditio)-propionila, reagente de
 5 Ellman, ácido diclorotriazínico e S-(2-tiopiridil)-L-
 cisteína.

O termo "proteína de fusão de sialidase" como
 utilizado na presente invenção refere-se a uma proteína de
 fusão em que um ou mais domínios são uma sialidase ou uma
 10 porção desta que retém pelo menos aproximadamente 60% ou 60%,
 aproximadamente 70% ou 70% ou aproximadamente ou em 75%, 80%,
 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de sua atividade
 catalítica. Uma proteína de fusão de sialidase como utilizada
 na presente invenção também pode se referir a uma proteína de
 15 fusão que contém uma proteína ou um polipeptídeo que seja
 substancialmente homólogo a uma sialidase e possua a
 atividade enzimática de uma sialidase.

O termo "domínio catalítico" de uma proteína como
 utilizado na presente invenção refere-se a uma proteína ou um
 20 polipeptídeo em que a única porção da sequência que é
 substancialmente homóloga a uma sialidase é uma sequência de
 resíduos de aminoácido que inclui o domínio responsável pela
 atividade catalítica da proteína (por exemplo, os resíduos
 274-666 da SEQ ID N°. 1 são identificados como o domínio
 25 catalítico de sialidase de *Actinomyces viscosus*) ou de
 fragmentos cataliticamente ativos destes. O domínio
 catalítico ou o fragmento cataliticamente ativo destes retém
 pelo menos aproximadamente 60% ou 60%, aproximadamente 70% ou
 70% ou aproximadamente ou em 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,
 30 97%, 98%, 99% ou mais da atividade catalítica da proteína.

Conforme utilizado na presente invenção, do termo
 "capacidade de fluxo característica" refere-se a uma
 propriedade que resulta na capacidade de "fluir", onde o

"fluxo" é uma propriedade que pode permitir que uma substância seja derramada e assuma o formato de um recipiente em que foi derramada, sem impedimento devido a, por exemplo, agregação. Os líquidos têm geralmente a propriedade de
5 "fluir", que geralmente os torna deformáveis, isto é, podem mudar seu formato. O termo "fluido" como utilizado na presente invenção abrange os colóides que contêm líquidos, incluindo emulsões, aerossóis e gases. Os líquidos, os aerossóis e os gases com suspensões de partículas sólidas,
10 tais como micropartículas, também são considerados "fluidos", conforme definido na presente invenção.

Conforme utilizado na presente invenção, uma emulsão é definida como um colóide de dois líquidos imiscíveis, de um primeiro líquido e de um segundo líquido,
15 onde o primeiro líquido é disperso no segundo líquido.

Conforme utilizado na presente invenção, os tensoativos (ou os "agentes de superfície ativos") são as entidades químicas ou naturais que, quando dissolvidas em uma solução aquosa, reduzem a tensão de superfície da solução ou
20 a tensão interfacial entre duas ou mais fases na solução. As moléculas de tensoativos geralmente são anfifílicas e contêm grupos principais hidrofílicos e caudas hidrofóbicas. As moléculas de tensoativos podem agir como estabilizantes e/ou aprimorar as características da capacidade de fluxo das
25 micropartículas providas na presente invenção.

Conforme utilizado na presente invenção, uma combinação refere-se a qualquer associação entre dois ou entre mais artigos para uma finalidade. Por exemplo, uma combinação de micropartículas e de um inalador pode ser
30 utilizada para a aplicação pulmonar de um agente terapêutico.

Conforme utilizado na presente invenção, uma composição refere-se a qualquer mistura. Pode ser uma solução, suspensão, líquido, pó, pasta, uma solução aquosa,

não-aquosa ou qualquer combinação destes.

Conforme utilizado na presente invenção, um kit refere-se a uma combinação em que os componentes são acondicionados opcionalmente com instruções para a utilização e/ou os reagentes e o aparelho para a utilização com a combinação.

Conforme utilizado na presente invenção, o termo "enzima" significa uma proteína que catalisa uma reação química ou um processo biológico. As enzimas geralmente facilitam e/ou aceleram tais reações e processos. Além disso, as enzimas são geralmente específicas para uma reação ou um processo particular, convertendo um conjunto específico de reagentes em produtos específicos.

Conforme utilizado na presente invenção, o termo "colóide" refere-se a uma dispersão de partículas sólidas, tais como micropartículas, em um líquido, tal como a solução em que as micropartículas são formadas. O termo "estabilidade coloidal" refere-se a um colóide em que as partículas não são agregadas substancialmente. Por exemplo, um colóide estável é um em que aproximadamente 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% ou menos das partículas sólidas, tais como micropartículas, formaram agregados.

O termo "aglomerados" refere-se à associação de uma ou mais partículas, tais como as microesferas, mantidas frouxamente juntas pelas forças van der Waals ou pela tensão de superfície ou eletrostática ou por combinações destas. Em alguns exemplos, as associações mantidas por forças eletrostáticas podem ser definidas como "floculados". Para as finalidades da presente invenção, os "aglomerados" abrangem também os "floculados". Os aglomerados podem ser geralmente facilmente rompidos pelas forças de cisalhamento no ar ou em líquido. O termo "dispersão" ou "dispersividade" refere-se à capacidade de as partículas "fluírem", isto é, a extensão em

que o movimento não é impedido pela presença, por exemplo, de agregados.

O termo "agregados" refere-se à associação de uma ou mais partículas, tais como microesferas, precipitados amorfos, partículas similares a cristal ou vidro ou combinações destes. Os agregados não são geralmente facilmente rompidos, o que inibe sua capacidade de se dispersar ou formar suspensões homogêneas ou de formar aerossóis com propriedades desejáveis.

10 O termo "não-desnaturado" como utilizado na presente invenção refere-se às proteínas e significa uma conformação de uma proteína, isto é, sua estrutura secundária, estrutura terciária, estrutura quaternária ou combinações destas, que é essencialmente inalterada da
15 proteína em seu estado natural. Os termos "não-desnaturado" e "nativo" são utilizados permutavelmente na presente invenção e significam uma proteína que retém tudo ou pelo menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de seu comprimento e/ou
20 conformação natural. Os termos "não-desnaturado" ou "nativo" como utilizados permutavelmente incluem na presente invenção o estado natural de uma proteína em uma célula, tal como seu comprimento e conformação incluindo estruturas secundárias, terciárias e quaternárias. Conforme definido na presente
25 invenção, as proteínas "não-desnaturadas" ou "nativas" incluindo aquelas nas composições providas na presente invenção retêm geralmente tudo ou pelo menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da atividade ou função normal das proteínas
30 em seu estado natural, por exemplo, como um nutriente para prover blocos de construção de aminoácido, um antioxidante, uma enzima, um anticorpo, um regulador da expressão de genes, uma estrutura de suporte, etc.

Conforme utilizado na presente invenção, os termos "atividade" ou "função" são permutáveis com "atividade biológica" e referem-se às atividades *in vivo* de um composto, tais como uma proteína, uma vitamina, um mineral ou uma droga ou as respostas fisiológicas que resulta da administração *in vivo* de um composto, composição ou de outra mistura. A atividade, desse modo, abrange efeitos terapêuticos e a atividade farmacêutica dos compostos, das composições e das misturas. As atividades biológicas também podem ser observadas nos sistemas *in vitro* projetados para teste ou utilização de tais atividades.

Conforme utilizado na presente invenção, a "atividade funcional" também é permutável com "atividade", "atividade biológica" ou "função" e refere-se a um polipeptídeo ou a uma porção deste que indica uma ou mais atividades associadas com a proteína nativa ou não-desnaturada. As atividades funcionais incluem, mas não são limitadas à atividade biológica, atividade catalítica ou enzimática, antigenicidade (capacidade de se ligar a competir com um polipeptídeo para se ligar a um anticorpo de antipolipeptídeo), imunogenicidade, a capacidade de formar multímeros e a capacidade de se ligar especificamente a um receptor ou a um ligando para o polipeptídeo.

O termo "desnaturado" como utilizado na presente invenção refere-se a uma proteína que é alterada em sua conformação nativa ou não-desnaturada, isto é, em suas estruturas ou combinações secundárias, terciárias ou quaternárias. A conformação alterada ocorre geralmente pelas etapas de processamento que incluem a pasteurização, a radiação, o calor, os produtos químicos, a ação das enzimas, a exposição aos ácidos ou alcalóides e pela troca de íons e por todas as combinações destes. A desnaturação de uma proteína resulta geralmente em diminuir todas ou algumas,

geralmente mais de 50% e pelo menos aproximadamente 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% das propriedades originais incluindo a atividade e a função da proteína em seu estado nativo ou não-desnaturado.

5 Conforme utilizado na presente invenção, o termo "suplemento nutritivo" significa uma substância ou uma composição que provê nutrientes, incluindo vitaminas, minerais, ácidos graxos, aminoácidos, carboidratos, enzimas, proteínas, bioquímicos e seus metabólitos, ervas e plantas, a
10 um hospedeiro, tal como um animal, incluindo o ser humano. Os nutrientes que são providos ao hospedeiro através de suplementos nutritivos podem incluir os nutrientes essenciais para a sobrevivência, uma boa saúde, a cura de doenças ou para impedir doenças que estão faltando ou deficientes na
15 dieta de um hospedeiro, e os nutrientes que são considerados para aumentar a boa saúde, para impedir doenças ou curar doenças, mas não são considerados essenciais para a sobrevivência ou a boa saúde.

 Conforme utilizado na presente invenção,
20 "hidrofóbico" refere-se a uma substância que não é carregada nem polarizada por carga ou suficientemente não é carregada nem polarizada pro carga para se ligar com a água ou outros solventes polares. Os ligandos hidrofóbicos podem se associar entre si ou com outras moléculas ou solventes não-polares na
25 presença de água ou de um solvente polar, através de interações hidrofóbicas. Um ligando hidrofóbico também é geralmente mais solúvel em solventes não-polares do que em solventes polares. Os exemplos de solventes não-polar incluem os alcanos tais como o hexano, éteres de alquila tais como o
30 éter de dietila, hidrocarbonetos aromáticos tais como haletos de benzeno e de alquila tais como o cloreto de metileno e o tetracloreto de carbono, mono-, di- e triglicerídeos, ácidos graxos, tais como o ácido oléico, linoléico, palmítico,

esteárico, formas conjugadas destes e seus ésteres.

Conforme utilizado na presente invenção, o termo "agente terapêutico" significa um agente que, quando da administração a um hospedeiro, incluindo os seres humanos, eficazmente aprimora ou elimina os sintomas ou as manifestações de uma doença herdada ou adquirida ou que cura esta dita doença.

Conforme utilizado na presente invenção, "a vida útil" ou a "estabilidade" referem-se ao tempo depois da preparação da composição de micropartícula que a composição retém pelo menos aproximadamente ou 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da atividade inicial da proteína que está presente na composição e outras características físicas gerais das microesferas tais como o tamanho, o formato e a distribuição de tamanho aerodinâmica da partícula. Desse modo, por exemplo, uma composição que é estável para ou tem uma vida útil de 30 dias à temperatura ambiente, definida na presente invenção como uma faixa entre aproximadamente 18°C a aproximadamente 25°C, 26°C, 27°C ou 28°C, teria pelo menos aproximadamente 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da quantidade inicial da atividade da proteína presente na composição em trinta dias após a armazenagem de 18°C a aproximadamente 25°C, 26°C, 27°C ou 28°C. A vida útil das composições de micropartícula providas na presente invenção é geralmente pelo menos aproximadamente dez dias a 55°C, pelo menos aproximadamente 2-3 semanas a 42°C e pelo menos aproximadamente oito meses ou mais a 25°C, no entanto, as composições de micropartícula de qualquer comprimento de vida útil em qualquer temperatura que são produzidas pelos métodos providos na presente invenção são contempladas na presente invenção.

Conforme utilizado na presente invenção, um "agente

biologicamente ativo", um "agente ativo", um "agente biológico" ou "um agente" "é qualquer substância que, quando introduzida no corpo, causa uma resposta biológica desejada, tal como a alteração da função do corpo em nível celular, tissular ou orgânico e/ou a alteração da aparência cosmética, tal como o peso corpóreo e a forma física. Tal substância pode ser qualquer elemento ou composto sintético ou natural, proteína, célula ou tecido incluindo um produto farmacêutico, uma droga, um suplemento terapêutico, nutritivo, uma erva, um hormônio ou outros ainda, ou quaisquer combinações destes. Os termos também abrangem derivados farmacêuticamente aceitáveis, derivados farmacologicamente ativos desses agentes ativos mencionados especificamente na presente invenção, incluindo, mas não se limitando aos sais, ésteres, amidas, pró-drogas, metabólitos ativos, isômeros, fragmentos, análogos e outros ainda. Quando o termo "agente biologicamente ativo", "agente biológico" e "agente" é utilizado ou quando um agente ativo particular é especificamente identificado, pretende-se incluir o agente ativo em si bem como os sais farmacêuticamente aceitáveis, farmacologicamente ativos, ésteres, amidas, pró-drogas, metabólitos ativos, isômeros, fragmentos e análogos.

Conforme utilizado na presente invenção, um "indivíduo" é definido como um animal, incluindo um mamífero, tipicamente um ser humano.

Conforme utilizado na presente invenção, uma "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de agente ativo para uma terapêutica desejada, profilática ou outro efeito ou resposta biológica quando uma composição é administrada a um indivíduo em uma única forma de dosagem. A quantidade particular de agente ativo em uma dosagem variará extensamente de acordo com condições tais como a natureza do agente ativo, a natureza da doença que está

sendo tratada, a idade e o tamanho do indivíduo.

Conforme utilizados na presente invenção, os "derivados farmaceuticamente aceitáveis" de um composto incluem sais, ésteres, éteres de enol, ésteres de enol, ácidos, bases, solvatos, hidratos ou pró-drogas destes. Tais derivados podem ser facilmente preparados pelos elementos versados na técnica utilizando métodos conhecidos para tal derivatização. Os compostos produzidos podem ser administrados aos animais ou aos seres humanos sem efeitos tóxicos substanciais e são farmaceuticamente ativos ou são pró-drogas. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a sais de amina, como mas não limitados a N,N'-dibenziletilenodiamina, cloroprocaína, colina, amônia, dietanolamina e outras hidroxialquilaminas, etilenodiamina, N-metilglucamina, procaína, N-benzilfenetilamina, 1-para-clorobenzil-2-pirrolidin-1'-ilmetilbenzimidazol, dietilamina e outras alquilaminas, piperazina e tris(hidroximetil)aminometano; sais de metais alcalinos, como mas não limitado ao lítio, ao potássio e ao sódio; sais de metais alcalinos terrosos, como mas não limitados ao bário, ao cálcio e ao magnésio; sais de metais de transição, como mas não limitados ao zinco; e outros sais de metal, como mas não limitado ao fosfato do hidrogênio de sódio e ao fosfato dissódico; e também incluindo, mas não se limitando a sais de ácidos minerais, como mas não limitados aos cloridretos e aos sulfatos; e sais de ácidos orgânicos, como mas não limitados aos acetatos, lactatos, maleatos, tartaratos, citratos, ascorbatos, succinatos, butiratos, valeratos e fumaratos. Os ésteres farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados aos ésteres de alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila, aralquila, heteroaralquila, cicloalquila e heterociclila de grupos ácidos, incluindo, mas não se limitando aos ácidos carboxílicos, ácidos fosfóricos, ácidos

fosfínicos, ácidos sulfônicos, ácidos sulfínicos e ácidos borônicos.

Conforme utilizado na presente invenção, o "tratamento" significa qualquer maneira em que um ou mais dos
5 sintomas de um quadro clínico, de um distúrbio ou de uma doença são aprimorados ou benéficamente alterados de outra maneira. O tratamento também abrange qualquer utilização farmacêutica das composições na presente invenção, como a utilização para tratar o influenza.

10 Conforme utilizado na presente invenção, o "solvente orgânico" refere-se a um solvente que é um composto orgânico, que é qualquer elemento de uma grande classe de compostos químicos cujas moléculas contêm carbono e hidrogênio. Tais solventes podem incluir, por exemplo,
15 compostos das seguintes classes: álcoois alifáticos ou aromáticos, polióis, aldeídos, alcanos, alquenos, alquinos, amidas, aminas, compostos aromáticos, compostos azo, ácidos carboxílicos, ésteres, dioxanos, éteres, haloalcanos, iminas, imidas, cetonas, nitritos, fenóis e tióis.

20 Conforme utilizado na presente invenção, um "solvente aquoso" refere-se à água ou a uma mistura de solventes que contém pelo menos aproximadamente 50% ou 50%, pelo menos aproximadamente 60% ou 60%, pelo menos aproximadamente 70% ou 70% ou de aproximadamente ou em 75%,
25 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou quantidades mais elevadas de água. O termo "solvente aquoso" conforme utilizado na presente invenção também se refere às soluções que contêm água como um solvente, tal como tampões, soluções salinas, soluções que contêm contraíons e outros solutos que
30 são solúveis em água.

Conforme utilizado na presente invenção, o termo "pi" ou "ponto isoelétrico" refere-se ao pH em que não há nenhuma carga líquida em uma proteína ou em um polipeptídeo.

Conforme utilizado na presente invenção, o termo "contraíon" refere-se a uma molécula carregada ou polarizável por carga que pode iniciar a formação de uma micropartícula a partir de uma macromolécula, tal como uma proteína, um ácido nucléico, um lipídeo ou um oligossacarídeo. Por exemplo, no caso da proteína de fusão DAS181 (ID SEQ N°. : 17), o sulfato de sódio é um contraíon porque pode iniciar a formação de micropartículas nos métodos providos na presente invenção, visto que a glicina, o cloreto de sódio ou o acetato de sódio não são geralmente apropriados como contraíons para DAS181. Se uma molécula carregada é um contraíon, pode ser determinada empiricamente com base em parâmetros incluindo, mas não se limitando ao tipo de proteína, pH, resistência iônica, tipo de solvente orgânico utilizado e a presença de sais e de ingredientes adicionais tais como os agentes ativos. Conforme provido e descrito na presente invenção, os contraíons podem ser aniônicos ou ter uma carga negativa líquida ou grupo(s) polarizável(is) por carga, catiônicos ou ter uma carga positiva líquida ou grupo(s) polarizável(is) por carga ou switeriônicos e ter grupos carregados positiva e negativamentee e grupoa polarizáveis por carga.

Conforme utilizado na presente invenção, o termo "resfriamento" refere-se à diminuição da temperatura a uma temperatura desejada para a obtenção de micropartículas ou, uma vez que as micropartículas são obtidas, diminuição da temperatura adicional a uma temperatura desejada para a obtenção de preparações de micropartículas a seco ao volatilizar os solventes (por exemplo, para secagem por congelamento). Os termos "resfriamento gradual" ou "refrigerar gradualmente" ou "gradualmente refrigerado" conforme utilizados na presente invenção significam que a diminuição da temperatura a uma temperatura desejada a partir da temperatura ambiente (de aproximadamente ou de 18°C a

aproximadamente 30°C) para a formação de micropartículas ocorre em uma taxa ou por uma quantidade de tempo que é apropriada para gerar micropartículas em uma solução antes que a solução se torne congelada. Desse modo, a resfriamento
5 gradual é diferente, por exemplo, do congelamento brusco, secagem por aspersão ou secagem por aspersão congelada, por meio de que a solução inteira é convertida em uma forma sólida sem a geração de micropartículas distintas.

A taxa de resfriamento gradual é determinada empiricamente com base no tipo de macromolécula, de
10 solventes, de contraíons e de outros ingredientes bem como o método de resfriamento (por exemplo, um trocador de calor, um refrigerador ou um freezer ou um secador por congelamento) e pode variar, por exemplo, para uma quantia de tempo para a
15 formação de micropartículas entre aproximadamente ou em 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 5 minutos, 7 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 1 h, 2h, 5h ou 10 h a aproximadamente ou 1,5 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 5 minutos, 7 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20
20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 1 h, 2 h, 5 h, 10 h ou 15 h.

Conforme utilizado na presente invenção, o termo "resfriamento" refere-se à diminuição da temperatura a uma temperatura desejada para a obtenção de micropartículas ou, uma vez que as micropartículas de dimensões desejadas são
25 obtidas, diminuição adicional da temperatura a uma temperatura desejada para a obtenção de preparações de micropartículas a seco ao volatizar os solventes (por exemplo, para secagem por congelamento). Os termos "resfriamento gradual" ou "refrigerar gradualmente" ou
30 "refrigerado gradualmente" conforme utilizados na presente invenção significam a diminuição da temperatura a uma temperatura desejada a partir da temperatura ambiente em que a solução de coquetel foi formada (de aproximadamente ou a -

15°C a aproximadamente ou a 50°C, geralmente de aproximadamente ou a 18°C a aproximadamente ou a 30°C) para que a formação de micropartículas ocorra a uma taxa ou por uma quantia de tempo que é apropriada para gerar
5 micropartículas de dimensões desejadas em uma solução antes que a solução se torne congelada. Desse modo, a resfriamento gradual é diferente, por exemplo, do congelamento brusco, secagem por aspersão ou secagem por aspersão congelada, por meio de que a solução inteira é convertida em uma forma
10 sólida sem a geração de micropartículas distintas.

A taxa de resfriamento gradual é empiricamente determinada com base no tipo de macromolécula, solventes, contraíons e de outros ingredientes bem como o método de resfriamento (por exemplo, um trocador de calor, um
15 refrigerador ou um freezer ou um secador por congelamento) e pode variar, por exemplo, por uma quantia de tempo para a formação de micropartículas entre aproximadamente ou em 0,1 segundo, 0,2 segundo, 0,5 segundo, 1 segundo, 10 segundos, 20 segundos, 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, 1 minuto, 2
20 minutos, 3 minutos, 5 minutos, 7 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 1 h, 2 h, 5 h ou 10 h a aproximadamente ou em 1,5 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 5 minutos, 7 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 1 h, 2 h, 5 h, 10 h ou 15
25 h.

Micropartículas de tamanho desejado também podem ser formadas, por exemplo, ao rapidamente esfriar o coquetel (utilizando, por exemplo, um trocador de calor) e permitindo que a suspensão de micropartículas seja mantida por um
30 determinado período de tempo sem mudanças de temperatura significativas, e então ao congelar bruscamente o coquetel.

A temperatura em que as micropartículas são formadas também é determinada empiricamente com base no tipo

de macromolécula, solventes, contraíons e de outros ingredientes bem como o método e uniformidade de resfriamento e pode variar de aproximadamente ou a 15°C, 10°C, 8°C, 5°C, 3°C, 2°C, 1°C, -2°C, -5°C, -7,5°C, -10°C, -15°C, -20°C, -
5 25°C, -30°C, -35°C, -40°C ou -45°C.

Conforme utilizado na presente invenção, o termo "secagem por pulverizador" refere-se a um processo em que uma solução que contém uma macromolécula, tal como uma proteína, é transformada em uma forma particulada seca atomizando em um
10 meio de secagem a quente, geralmente por um período de aproximadamente alguns milissegundos a 1-2 segundos a algumas dezenas de segundos. O termo "secagem por aspersão congelada" como utilizado na presente invenção refere-se a um processo em que uma solução que contém uma macromolécula, tal como uma
15 proteína, é atomizado em um meio criogênico, tal como em nitrogênio líquido, para obter as gotas congeladas da solução que podem então ser secadas por liofilização. O termo "congelamento brusco" ou "congelamento rápido" ou "congelar rapidamente" como utilizado permutavelmente na presente
20 invenção refere-se ao congelamento de um solvente ou de uma solução, incluindo as soluções que contém macromoléculas, tais como proteínas, ao imergir o recipiente com boas propriedades de transferência de calor (por exemplo, vidro de parede fina ou tubo de teste de metal) mantendo o solvente ou
25 a solução em nitrogênio líquido ou derramando a solução diretamente em nitrogênio líquido. O "congelamento brusco" e o "congelamento rápido" ocorrem geralmente dentro de um período de aproximadamente alguns milissegundos a 1-2 segundos a algumas dezenas de segundos.

30 O termo "liofilizar" ou "liofilização" como utilizado na presente invenção é sinônimo com a "secagem por congelamento" e refere-se a um processo em que uma solução, incluindo uma emulsão, colóide ou suspensão, é congelada e os

solventes são volatilizados diretamente em estado de vapor, deixando para trás os componentes sólidos.

B. Métodos para a Preparação de Micropartículas Macromoleculares

5 Composições

São providos na presente invenção os métodos de elaboração de microesferas que têm um teor elevado de uma macromolécula, tal como uma proteína. As microesferas providas na presente invenção são preparadas por precipitação controlada na presença de um contraíon e de um solvente orgânico. As microesferas são apropriados para preparar as composições farmacêuticas que podem ser aplicadas a um paciente por vias de aplicação que incluem as vias de administração pulmonar, parenteral e oral. O método também pode ser executado em um grupo ou em um modo contínuo, para a eficiência e a produção aumentadas.

As microesferas obtidas pelos métodos providos na presente invenção são úteis como agentes profiláticos, terapêuticos ou agentes de diagnóstico para tratar ou diagnosticar estados de doenças em um indivíduo *in vivo* ou *in vitro*. Os tamanhos das microesferas obtidas pelos métodos providos na presente invenção podem ser controlados ao ajustar os parâmetros incluindo o tipo e a concentração de solvente orgânico, a concentração de proteínas ou de macromoléculas, a resistência iônica, o tipo e a concentração de contraíons, a taxa e o período de resfriamento, para prover microesferas em uma ampla faixa de tamanhos, de 0,001 micron a 50 micras ou mais, que podem aplicar agentes terapêuticos através de uma via desejada que incluía via pulmonar (por exemplo, partículas de 1 micra a 5 micras para a aplicação à garganta, à traquéia e aos brônquios para o tratamento do influenza e de outras infecções respiratórias), subcutânea, intramuscular, intravenosa e outras (por exemplo,

utilizando partículas com dezenas de micras de tamanho) resultam em componentes ativos de remédios inaláveis para indivíduos humanos.

As etapas do método provido na presente invenção incluem: a combinação de uma solução que contém a macromolécula com um contraíon e um solvente orgânico e a resfriamento gradual da solução resultante a uma temperatura por meio de que as micropartículas são formadas. Em uma realização, as etapas podem ser descritas como segue:

10 1) A uma solução que contém uma macromolécula, tal como uma proteína, um ácido nucléico, um oligossacarídeo ou um lipídeo, adicionar um contraíon e um solvente orgânico a concentrações que não causem a precipitação de macromoléculas à temperatura ambiente;

15 2) Precipitação: resfriamento do coquetel de macromolécula/solvente para iniciar a formação de microesferas; e

 3) Desidratação: congelamento da suspensão e remoção do solvente orgânico e da água por sublimação (secagem por congelamento, por exemplo, a uma temperatura de
20 aproximadamente -20°C a aproximadamente -80°C ou de aproximadamente -30°C a aproximadamente -80°C ou de aproximadamente -40°C a aproximadamente -80°C ou de aproximadamente -45°C a aproximadamente -80°C ou de
25 aproximadamente -45°C a aproximadamente -75°C).

As etapas do método acima podem ser executadas seqüencialmente, intermitentemente ou simultaneamente em qualquer ordem. Em uma realização, o contraíon e o solvente orgânico são adicionados simultaneamente ou seqüencialmente
30 em qualquer ordem à solução que contém a macromolécula, seguido pelo resfriamento. Em outras realizações, a solução que contém a macromolécula pode ser pré-resfriada a uma temperatura apropriada para a formação de microesferas, antes

de adicionar o contraíon e o solvente orgânico. Por exemplo, uma solução aquosa pré-resfriada de uma macromolécula, tal como uma proteína, pode ser combinada com o sulfato e o acetonitrilo de amônio para a formação de microesferas.

5 A suspensão de micropartículas resultante pode ser convertida em um pó seco para a resfriamento adicional a uma temperatura abaixo do ponto de congelamento e a remoção subsequente dos voláteis (água, solvente orgânico e onde possível o contraíon) por meio de, por exemplo, sublimação, 10 utilizando um secador por congelamento padrão.

 Em uma realização, as microesferas formadas ao entrar em contato com a macromolécula com um contraíon e o solvente orgânico e expostas à baixa temperatura são separadas da suspensão por métodos que incluem as técnicas de 15 sedimentação ou de filtração. Depois da separação da mistura de precipitação original, as microesferas podem ser lavadas e/ou combinadas com outros materiais que aprimoram e/ou modificam as características das macromoléculas e das microesferas.

20 Em uma outra realização, as microesferas preparadas pelos métodos providos na presente invenção não têm um efeito terapêutico direto, mas servem como microveículos para o(s) outro(s) agente(s) terapêutico(s) ou o(s) agente(s) ativo(s) incluindo os suplementos nutritivos. Os agentes terapêuticos 25 podem ser adicionados quando da precipitação ou podem ser adicionados à suspensão de microesferas formada antes da liofilização. Alternativamente, os agentes terapêuticos podem ser misturados em um pó seco que consiste em microesferas.

 Sem ser limitado por qualquer teoria, em um 30 aspecto, os métodos providos na presente invenção podem permitir a formação de microesferas por meio de: (1) neutralização das cargas na superfície das macromoléculas pelo contraíon e (2) solubilidade diminuída das

macromoléculas causada pelos efeitos combinados do solvente orgânico adicionado e da resfriamento gradual.

5 Ao escolher um pH apropriado na faixa de aproximadamente ou ao pH 2,0 a aproximadamente ou ao pH 10,5 ou mais, dependendo da macromolécula, do contraíon e do solvente orgânico, na presença de uma quantidade apropriada de contraíon, um número substancial de grupos carregados, em alguma realização todos os grupos carregados, na superfície da macromolécula pode se tornar neutralizado. Uma diminuição
10 na polaridade da solução pela adição de um solvente orgânico apropriado pode iniciar então a formação de microesferas por precipitação, separação de fase, formação de colóide ou por outro método.

15 Alternativamente, sem ser limitado por qualquer teoria, em algumas realizações, o fenômeno de precipitação das microesferas observado também pode ser explicado pelo efeito cosmotrópico (formação de estrutura) dos contraíons e dos solventes orgânicos devido às interações com as moléculas de água da solução aquosa que contém a macromolécula em
20 baixas temperaturas. Não obstante o mecanismo subjacente, nos métodos providos na presente invenção, a adição de quantidades relativamente pequenas de solvente orgânico e de contraíon a uma solução aquosa ou outra solução hidrofílica que contém uma macromolécula e a resfriamento da solução
25 resultam na produção de composições que contém microesferas de macromoléculas(s).

30 Em uma realização, a resfriamento gradual da solução de coquetel pode ser executada ao passar a solução de coquetel através de um trocador de calor. A temperatura do trocador de calor e a taxa de fluxo do coquetel através do trocador de calor podem ser ajustadas de modo que o coquetel seja pré-resfriado antes da formação de microesferas ou seja resfriado a uma temperatura por meio de que as microesferas

são formadas.

Em uma outra realização, as microesferas formadas pelos métodos providos na presente invenção são concentradas ou separadas da suspensão por métodos tais como técnicas de sedimentação ou de filtração. Quando da formação de microesferas, seu crescimento (tamanho) pode ser controlado pelo ajuste da resistência iônica, polaridade, pH ou outros parâmetros da suspensão. A separação das microesferas da fase líquida da solução de coquetel pode ser executada por meio de centrifugação, filtração (fibra oca, fluxo tangencial, etc.) ou outras técnicas. As microesferas resultantes ou as suspensões concentradas destas podem ser liofilizadas ou secadas no ar.

Em algumas realizações, as microesferas separadas da mistura de precipitação original ou as microesferas secadas podem ser reconstituídas antes da administração como um agente terapêutico ou um portador ou podem ser suspensas nas soluções que contêm os agentes que modificam as características das microesferas. Os agentes de modificação podem incluir mas não se limitam aos agentes de avolumação, excipientes, ingredientes inativos, intensificadores de estabilidade, modificadores de sabor e/ou de odor ou agentes de mascaração, vitaminas, agentes terapêuticos, antioxidantes, imunomoduladores, modificadores do transporte de transmembrana, agentes anti formação de torta, agentes de revestimento entéricos, agentes que conferem resistência ácida, tal como contra os ácidos do sistema digestivo, os agentes que conferem resistência à protease, quitosanas, polímeros e intensificadores da capacidade de fluxo.

A formação e as características das microesferas produzidas pelos métodos providos na presente invenção podem ser empiricamente determinadas ao variar os parâmetros, incluindo: natureza e concentração de macromoléculas, pH da

solução de coquetel, natureza e concentração de contraíon, natureza e concentração de solvente orgânico, resistência iônica e taxa de resfriamento pela qual a resfriamento gradual é efetuada. As etapas dos métodos providos na presente invenção resultam no método tratável pela varredura de efluência elevada, tal como em um formato de microplaca, para determinar combinações de macromoléculas apropriadas, o solvente orgânico, o contraíon, o pH, a resistência iônica e a rampa de resfriamento para a geração de microesferas.

10 Macromoléculas

As macromoléculas que podem ser utilizadas para a formação de microesferas de acordo com os métodos providos na presente invenção incluem uma variedade de agentes terapêuticos, agentes de diagnóstico, agentes nutritivos e outros agentes ativos. Os agentes terapêuticos incluem antibióticos, vacinas, hematopoiéticos, agentes anti-infecciosos, agentes anti-úlceras, agentes anti-alérgicos, antipiréticos, analgésicos, agentes anti-inflamatórios, agentes anti-demência, agentes antivirais, agentes antitumorais, antidepressivos, agentes psicotrópicos, cardiotônicos, agentes antiarrítmicos, vasodilatadores, agentes anti-hipertensivos, agentes anti-diabéticos, anticoagulantes e agentes para a diminuição do colesterol. Outros exemplos de macromoléculas apropriadas incluem proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, carboidratos, conjugados de proteínas, vírus, partículas de vírus e misturas destes.

As macromoléculas podem ser caracterizadas por sua capacidade de interagir com o contraíon e o solvente orgânico, tal como o citrato (contraíon) e o isopropanol (solvente), para formar microesferas distintas e intactas que contêm um teor elevado de macromoléculas. O teor de macromoléculas nas microesferas pode variar de

aproximadamente ou em 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou em um peso/peso maior de microesferas. Em algumas realizações, o teor de macromoléculas da microesfera é substancialmente o mesmo que a quantidade de macromolécula inicialmente na solução, antes da formação de microesferas.

As macromoléculas utilizadas para preparar microesferas pelos métodos providos na presente invenção podem incluir peptídeos, incluindo polipeptídeos e proteínas, carboidratos, incluindo os polissacarídeos e os ácidos nucleicos (DNA, RNA ou PNA). Em algumas realizações, as macromoléculas são proteínas, incluindo proteínas terapêuticas tais como DAS181 (a proteína de fusão de sialidase que tem a seqüência dos resíduos de aminoácido determinados na SEQ ID N°. 17), alfa1-antitripsina, PI8, eglina c, Ecotin, aprotinina, DNase humano recombinante, insulina, interferons, dNase humano recombinante (rhDNase, útil, por exemplo, no tratamento da fibrose cística como uma inalação terapêutica (Genentech); vide também Shak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 87: 9188-9192 (1990)), albumina do soro humana, hormônio humano do crescimento, hormônio paratireóide e calcitonina. Em algumas realizações, a proteína é DAS181, o contraíon é sulfato de sódio ou citrato de sódio e o solvente orgânico é isopropanol.

Os métodos providos na presente invenção podem evitar a utilização de condições tais como o aquecimento, que pode desnaturar a proteína e reduzir sua atividade. As microesferas apresentadas de acordo com os métodos providos na presente invenção podem, portanto, ser utilizadas para preparar vacinas ou outras medicações terapêuticas que requerem que as proteínas ou os peptídeos estejam presentes em sua conformação nativa.

A concentração de macromoléculas na solução,

utilizada durante a precipitação das microesferas, pode estar entre aproximadamente ou em 0,1 mg/ml a aproximadamente ou em 0,2, 0,5, 0,8, 1,0, 2,0; 5,0, 10,0, 12,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 35,0, 40,0, 45,0, 50,0, 60,0, 70,0, 80,0, 90,0, 100 ou 5 200 mg/ml. Em algumas realizações, a concentração está entre aproximadamente ou em 1 mg/ml e de aproximadamente ou em 20 mg/ml. Dependendo das características das macromoléculas (pI , hidrofobicidade, solubilidade, estabilidade, etc.) e outros parâmetros do processo, a concentração de macromoléculas pode 10 ser empiricamente determinada para conseguir a formação de microesferas de um tamanho desejado. Em geral, as macromoléculas com solubilidade mais baixa no solvente (geralmente, solvente aquoso) antes de adicionar o contraíon e o solvente orgânico podem ser utilizadas a concentrações 15 mais baixas (em 0,1 - 5 mg/ml) para formar as microesferas de acordo com os métodos na presente invenção, sendo que as macromoléculas com solubilidade mais elevada podem ser utilizadas a 1 - 20 mg/ml ou mais. Se a formação de agregados amorfos ou de microesferas agregadas for observada, a 20 concentração de macromoléculas geralmente deve ser diminuída para reduzir ou impedir tal agregação.

Natureza e concentração do contraíon

O contraíon pode ser qualquer composto capaz de neutralizar um ou mais grupos carregados opostamente na 25 macromolécula ao pH em que o método é executado. Dependendo das características das macromoléculas (pK , pI , natureza e quantidade de grupos carregados, distribuição de grupos de carga na superfície, solubilidade e estabilidade estrutural sob condições de pH diferentes), o pH pode ser empiricamente 30 determinado para a formação de microesferas. Em geral, se a precipitação for executada a um pH abaixo do pK das macromoléculas, os contraíons aniônicos podem ser utilizados. Em geral, se a precipitação for executada em um pH acima do

pK das macromoléculas, os contraíons catiônicos podem ser utilizados. O contraíon pode ser empiricamente selecionado com base em sua adequabilidade para iniciar a formação de microesferas. Em algumas realizações, o contraíon pode ter um
 5 peso molecular de 60 Da ou mais ou aproximadamente 75 Da ou mais.

Os contraíons podem ser aniônicos, catiônicos ou switeriônicos. Os contraíons aniônicos podem ser inorgânicos (fosfato, sulfato, tiocianato, tiosulfato, hipoclorato,
 10 nitrato, bromo, iodo, etc.) ou compostos orgânicos que carregam grupos polarizáveis por carga incluindo enol, hidróxi, -SH, carboxílico, carboximetila, sulfopropila, sulfônico e fosfórico. Os compostos orgânicos que carregam outros grupos aniônicos ou que têm carga negativa devido a
 15 outras características moleculares também podem ser utilizados. Os compostos que podem ser utilizados como contraíons aniônicos também incluem, mas não são limitados ao seguinte: oxaloacetato, malato, maleato, oxalato, piruvato, citrato, succinato, fumarato, cetoglutarato, ácido
 20 butanotricarboxílico, ácido hidromucônico, ácido ciclobutanodicarboxílico, maleato de dimetila, ácido deoxirribonucléico, ácido poliglutâmico, ácido fólico, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido carmínico, ácido sórbico, ácido malônico, EDTA, MOPS, TES, MES, PIPES, piridina,
 25 tricina, glicina, glicilglicina, betaína, ácido sulfúrico, ácido tiosulfúrico, ácido fosfórico, trifosfato de adenosina, ácido nítrico, ácido itacônico, ácido piválico, ácido dimetilmalônico e ácido perclórico. Em algumas realizações, os ácidos itacônico, piválico, dimetilmalônico e
 30 succínico são utilizados como contraíons nos métodos proveram na presente invenção.

Os contraíons catiônicos podem ser inorgânicos (amônio, fosfônio, sulfônio, cézio, rubídio, etc.) ou

compostos orgânicos que carregam os grupos conhecidos como amina, amida, imina, imida, guanidina, imidazol, dioxano, anilina. Os compostos orgânicos que carregam outros grupos catiônicos ou que têm a capacidade de polarização de carga positiva devido a outras características moleculares também podem ser utilizados. Os compostos que podem ser utilizados como contraíons catiônicos também incluem, mas não são limitados ao seguinte: Tris, Bis-Tris, Bis-Tris propano, diaminopropano, piperazina, piperadina, pentilamina, diaminobutano, propilamina, trimetilamina, trietilamina, espermina, espermidina, putrescina, cadaverina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, imidazol, tetrametilamônio, trimetilamônio, amônio, cézio, rubídio, imidazol, polietileneimina, DEAE, TEAE, QAE.

Os contraíons switeriônicos que têm todos os grupos carregados em qualquer combinação também podem ser utilizados. Os compostos que podem ser utilizados como contraíons switeriônicos incluem, mas não são limitados ao seguinte: HEPES, BICINE, glicina, glicilglicina, ácido 6-aminohexanóico, ácido piperídico, aminoácidos naturais e não-naturais (por exemplo, histidina, glutamina, arginina, lisina).

Os contraíons podem ser utilizados como ácidos (por exemplo, ácido sulfúrico) ou bases (por exemplo, imidazol) ou seus sais (por exemplo, sulfato de sódio ou imidazol-HCl). Os contraíons que podem ser utilizados nos métodos providos na presente invenção incluem aqueles relacionados pelo National Formulary, pela United States Pharmacopeia, pela Japanese Pharmacopeia ou pela European Pharmacopeia, cuja segurança clínica foi demonstrada (ácido cítrico, ácido málico, aminoácidos, sulfato, etc.). Em algumas realizações, os contraíons utilizados nos métodos providos na presente invenção incluem aqueles para os quais a segurança foi

estabelecida ou que se encaixam na categoria de GRAS (geralmente considerados como seguros). Os contraíons (ou seus sais) podem ser sólidos à temperatura ambiente (cerca de 25°C) ou na temperatura de utilização e de armazenagem pretendida. As combinações de dois ou mais contraíons também podem ser utilizadas. Os contraíons voláteis e líquidos também podem ser utilizados nos métodos providos na presente invenção.

A concentração de contraíon é mantida geralmente entre aproximadamente 0,1 mM e aproximadamente 0,2, 0,5, 0,8, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 80,0, 90,0 e 100,0 mM. Em algumas realizações, a concentração de contraíon está entre aproximadamente ou em 0,5 mM e de aproximadamente ou em 20 mM. Dependendo das características das macromoléculas (pl, hidrofobicidade, solubilidade, estabilidade, etc.) e outros parâmetros do processo, a concentração de contraíon pode ser empiricamente determinada utilizando, por exemplo, um formato de efluência elevada como provido na presente invenção. No geral, a formação de microesferas superdimensionadas, agregados amorfos ou microesferas agregadas indica que a concentração de contraíon deve ser diminuída, quando falha em formar microesferas (cristais ou flocos similares a vidro quebrados) ou a formação de microesferas abaixo do tamanho desejado indica que a concentração de contraíon deve ser aumentada.

Natureza e concentração do solvente orgânico

Um solvente orgânico adicionado ao coquetel nos métodos providos na presente invenção geralmente pode ser miscível em água e selecionado entre os álcoois (metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, butanol, álcool terbutílico), clorofórmio, cloreto de dimetila, álcoois de açúcar poliídricos (glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol, manitol), hidrocarbonetos aromáticos, aldeídos,

cetonas, ésteres, éteres (éter dietílico), alcanos (hexano, ciclohexano, éter de petróleo), alquenos, dienos conjugados, tolueno, diclorometano, acetonitrilo, acetato de etila, polióis, poliimidas, poliésteres, polialdeídos e misturas destes. Em algumas realizações, o solvente orgânico pode ser volátil. Em outras realizações, quando a incorporação do solvente orgânico nas microesferas é desejada, solventes orgânicos não-voláteis podem ser utilizados os quais provêm, por exemplo, novas características às microesferas (por exemplo, liberação prolongada ou resistência mecânica adicionada). A concentração de solvente orgânico pode ser geralmente mantida entre aproximadamente ou em 0,1%, a aproximadamente ou em 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% ou 50% em volume/volume (v/v). Em algumas realizações, a concentração de solvente orgânico está entre aproximadamente ou em 1% a aproximadamente ou em 30%, v/v. Os compostos orgânicos que são parcialmente miscíveis ou completamente imiscíveis em água também podem ser utilizados.

Os solventes orgânicos que podem ser utilizados nos métodos providos na presente invenção incluem os álcoois e outros relacionados como solventes dos Tipos 3 e 2 na International Conference on Harmonisation (ICH) Harmonised Tripartite Guideline (Impurities: Guideline for Residual Solvents), cuja manipulação segura foi estabelecida nas indústrias farmacêuticas e alimentícias.

Dependendo das características das macromoléculas (hidrofobicidade, solubilidade, estabilidade, etc.) e outros parâmetros do processo, a escolha e a concentração de solvente orgânico podem ser otimizadas, por exemplo, utilizando a varredura de efluência elevada em placas de microtitulação ou em microplaquetas similares ou em outro dispositivo. Em geral, a precipitação descontrolada antes da iniciação do resfriamento, a formação de microesferas

superdimensionadas, os agregados amorfos, as microesferas agregadas ou os agregados pegajosos indicam que a concentração de solvente orgânico deve ser diminuída, quando falha em formar microesferas (cristais ou flocos similares a vidro quebrados) ou a formação de microesferas abaixo do tamanho desejado indica que a concentração de solvente orgânico deve ser aumentada.

pH

Além de iniciar a formação de microesferas, o contraíon também pode servir como um tampão. Alternativamente, em algumas realizações, um composto de tamponamento pode ser utilizado para obter o pH desejado. Em algumas realizações, o composto de tamponamento é de 60 Da ou mais. Dependendo das características das macromoléculas (pI, hidrofobicidade, solubilidade e estabilidade em um pH específico, etc.) e outros parâmetros do processo, o pH mais favorável pode ser empiricamente ajustado para conseguir a formação de microesferas de dimensões desejadas e para preservar a atividade das macromoléculas. Em geral, a falha em formar microesferas (cristais ou flocos similares a vidro quebrados) indica que a proteína pode ser solúvel demais sob as condições utilizadas. A formação de agregados amorfos pode indicar que a precipitação não é bem controlada e a proteína pode não ser estável ou solúvel ao pH utilizado.

Quando a macromolécula é uma proteína, observou-se que determinadas combinações de proteína/contraíon podem causar a precipitação imediata e descontrolada em determinados valores de pH. Os métodos de varredura de efluência elevada providos na presente invenção podem ser utilizados para determinar empiricamente a combinação de proteína, do pH e do contraíon apropriada para formar microesferas de dimensões desejadas. Isto é facilmente solucionado ao alterar o pH do coquetel, utilizando um

contração diferente ou diminuindo a concentração de proteína no coquetel. Em geral, para formar microesferas com base em proteínas, um valor de pH que esteja abaixo do pI da proteína provê a formação mais favorável da microesfera.

5 Resistência iônica

A resistência iônica da solução de coquetel pode ser modulada pela concentração de contração ou por outros sais tais como cloretos ou acetatos. Em algumas realizações, nenhum sal adicional é requerido para produzir microesferas. 10 Em determinadas realizações, a resistência iônica pode ser ajustada para preservar a integridade e a atividade estruturais de macromoléculas. Exemplos de outras aplicações onde a presença de sais específicos pode ser benéfica inclui formulações de drogas parenterais e de outras drogas ou de 15 alimentos onde a capacidade específica de tonicidade ou de tamponamento pode ser requerida quando da reconstituição das microesferas.

Rampa de resfriamento

O coquetel que contém uma macromolécula, um 20 contração e um solvente orgânico é preparado inicialmente, antes da resfriamento, a uma temperatura em que a macromolécula é solúvel, geralmente aproximadamente -15°C a aproximadamente 30°C. Em algumas realizações, a temperatura inicial, antes da resfriamento está à temperatura ambiente 25 (18-25°C). As microesferas são formadas por um processo tal como a precipitação, a separação de fase ou a formação de colóide quando da resfriamento gradual a uma temperatura abaixo da temperatura em que a macromolécula é dissolvida na solução. A taxa em que a resfriamento é executada pode 30 controlar a formação e outras características tais como o tamanho das microesferas. Em geral, quando a macromolécula é uma proteína, o congelamento por evaporação em nitrogênio líquido não gera microesferas.

A taxa em que a resfriamento e o congelamento do coquetel (rampa de resfriamento) são executados pode determinar o tamanho final das microesferas. Em geral, uma rampa de resfriamento mais rápida resulta em microesferas menores visto que uma rampa de resfriamento mais lenta resulta em microesferas maiores. Sem ser limitado por qualquer teoria, a taxa de resfriamento pode determinar a taxa de: (1) nucleação que produz microesferas menores iniciais e (2) um processo de fusão em que as microesferas iniciais coalescem (são agregadas) e são recozidas em microesferas maiores. A fusão de partículas menores em maiores é um processo dependente de tempo que pode ser determinado, por exemplo, pela duração para a qual a suspensão líquida das microesferas existe antes de se congelar. Devido à natureza reversível das ligações entre determinadas macromoléculas, tais como algumas proteínas, nas composições de microesfera providas na presente invenção, as microesferas menores que são recozidas em partículas maiores podem gerar microesferas com superfícies lisas. Dependendo do tamanho das micropartículas desejado, a taxa de resfriamento pode ser de aproximadamente $0,01^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou de $0,01^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a aproximadamente $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou a $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$; de aproximadamente ou em $0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou de aproximadamente $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a aproximadamente ou a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou de aproximadamente $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$, de aproximadamente ou a $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a aproximadamente ou a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, de aproximadamente ou a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a aproximadamente ou a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou de aproximadamente $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Em algumas realizações, a rampa de resfriamento pode estar entre $0,1^{\circ}\text{C}$ por minuto e aproximadamente 40°C por minuto. Em outras realizações, uma rampa de resfriamento pode estar entre aproximadamente $0,5^{\circ}\text{C}$ por minuto e 15°C por minuto.

Dependendo das necessidades específicas, em algumas realizações pode ser desejável adaptar o processo de produção

ao equipamento específico. Em algumas realizações, um liofilizador com prateleiras com a temperatura controlada pode ser utilizado para refrigerar. Se as microesferas produzidas forem maiores do que o desejado, outros parâmetros do processo incluindo a concentração de macromoléculas, o solvente orgânico, o contraíon, a resistência iônica e/ou o pH podem ser modificados para conseguir a redução desejada no tamanho das microesferas.

Para uma rampa de resfriamento mais rápida (tamanho menor de partícula), a solução de coquetel pode ser passada através de um trocador de calor, tal como aquele utilizado em um modo contínuo. Se o tamanho das microesferas necessitar ser aumentado, as concentrações aumentadas de um dos ingredientes do coquetel (macromolécula, solvente orgânico, contraíon) podem prover o aumento desejado no tamanho das microesferas.

Em geral, a resfriamento deve ser executada uniformemente e a uma taxa constante para impedir a formação de agregados e de cristais. Dependendo da concentração de solvente orgânico, a precipitação de macromoléculas em microesferas pode ocorrer em diversas maneiras. Nas concentrações mais elevadas do solvente orgânico (aproximadamente 5% - 40%, dependendo dos componentes reais utilizados) as microesferas podem geralmente se formar quando a solução de coquetel estiver ainda na forma líquida. A concentrações mais baixas do solvente orgânico (2 - 25%, dependendo dos componentes reais utilizados), os cristais de gelo podem se formar primeiramente, depois do que as macromoléculas são expelidas e o solvente orgânico pode alcançar uma concentração local crítica e se precipitar. Uma diminuição adicional da temperatura na próxima camada inferior da bandeja do liofilizador pode conduzir ao término da solidificação da suspensão líquida e promover a expulsão

do solvente orgânico na camada superior. Um excesso de solvente orgânico na camada superior pode causar a precipitação descontrolada de macromoléculas e a agregação das microesferas. Este efeito geralmente pode ser aliviado ao
5 selecionar relações apropriadas dos componentes - macromolécula, contraíon, solvente orgânico, sais, etc. no coquetel. Além disso, manter uma camada fina de coquetel na bandeja de liofilização ou misturar o coquetel ao resfriar pode impedir a formação de agregados e de cristais e resultar
10 em microesferas uniformes. Por exemplo, se uma concentração relativamente baixa de isopropanol (por exemplo, 2-6%) for utilizada e uma camada fina de coquetel (10-20 mM) for preenchida na bandeja e a bandeja for colocada em uma prateleira pré-resfriada (-30 -75°C), microesferas uniformes
15 poderão ser obtidas.

Os métodos providos na presente invenção podem conduzir à incorporação de substancialmente todas ou de qualquer proteína ou outra macromolécula da solução em microesferas.

20 Varredura de efluência elevada das condições de formação de micropartículas e otimização da formação de partículas

Dependendo das características das macromoléculas, a composição da solução de coquetel utilizada para preparar
25 as microesferas de acordo com os métodos providos na presente invenção pode ser otimizada.

A otimização pode ser rapidamente executada em um meio ou em um formato de efluência elevada utilizando, por exemplo, uma placa de microtitulação ou microplaquetas onde dezenas a
30 centenas a milhares a dezenas de milhares de coquetéis podem ser selecionados simultaneamente. Em algumas realizações, um número de valores de pH conjuntamente com contraíons catiônicos, aniônicos ou switeriônicos e solventes orgânicos

em várias concentrações pode ser selecionado. Por exemplo, a seleção pode ser executada utilizando diversas placas de microtitulação idênticas, sendo que para cada uma delas a macromolécula de interesse é adicionada em várias concentrações. Cada conjunto de condições de teste pode ser selecionado em duplicata. Em algumas realizações, as microplacas com cavidades de fundo liso podem ser utilizadas com a saia da placa de microtitulação partida para permitir uma boa transferência de calor entre a prateleira do liofilizador e os fundos das cavidades. As microplacas podem ser colocadas nas prateleiras do liofilizador e ser refrigeradas para formar microesferas e subsequente-mente solidificar as suspensões. Quando do congelamento do conteúdo das cavidades, o vácuo pode ser aplicado. No fim da liofilização, uma das placas duplicadas pode ser reconstituída com água ou um tampão de escolha para observar se determinadas condições tornaram a macromolécula insolúvel ou reduziram sua atividade. As condições que resultaram no material que pode ser facilmente ressolubilizado ou prover microesferas com as características desejáveis podem ser submetidas a uma análise adicional por meio de ensaios espectroscópicos, cromatográficos, enzimáticos ou outros para confirmar que a estrutura e a atividade nativas estão preservadas. O material liofilizado em uma placa duplicada pode ser utilizado para a microscopia para determinar se as microesferas estão formadas. As condições que produziram microesferas podem ser adicionalmente modificadas e ajustadas finamente para produzir microesferas com tamanho e características desejáveis.

Os kits para a execução de varreduras de efluência elevada podem ser providos e podem conter todos os ingredientes utilizados nos métodos providos na presente invenção incluindo uma ou mais de uma macromolécula, tal como

uma proteína, tampões, coquetel pré-dispensado da composição conhecida (solvente orgânico, contraíon) e/ou sais. Os kits podem conter 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100 ou mais (tipicamente 96 ou mais) tampões com pH predeterminado, 5 contraíon, resistência iônica e o solvente orgânico em cada placa de microtitulação. A placa de microtitulação provida com o kit pode ser modificada de modo que os fundos das cavidades estejam em contato direto com a prateleira do liofilizador.

10 C. Composições de Micropartículas Macromoleculares

As macromoléculas contidas nas composições de micropartícula obtidas pelos métodos providos na presente invenção são substancialmente estrutural e quimicamente inalteradas pelos métodos. Por exemplo, quando a 15 macromolécula é a Proteína Fluorescente Verde ou a Proteína Fluorescente Vermelha, sua fluorescência e conformação e a atividade nativa das proteínas é retida nas micropartículas. As microesferas secas, obtidas ao volatilizar substancialmente todos os solventes e/ou umidade à exceção do 20 solvente e outros componentes associados com as microesferas, podem ser armazenados e sua atividade pode ser substancialmente recuperada quando da reconstituição. O teor de umidade relativamente baixo das micropartículas providas na presente invenção, por exemplo, entre aproximadamente ou 25 em 0,1% a aproximadamente ou em 0,2%, 0,3%, 0,5%, 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5%, 10,0%, 10,5%, 11,0%, 11,5%, 12,0%, 12,5%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18% 19% ou 20%, pode prover a estabilidade aprimorada. As microesferas obtidas pelos métodos providos na 30 presente invenção também são homogêneas no tamanho e no formato e podem ser obtidas de modo reproduzível com as características desejadas. Outras técnicas utilizadas tradicionalmente para a preparação de formulações a seco

(precipitação de sal, precipitação de álcool ou de acetona, liofilização, por exemplo) podem resultar na desnaturação completa ou parcial das macromoléculas, tais como as proteínas. Além disso, as microesferas preparadas pelos métodos providos na presente invenção evitam a necessidade de secagem por pulverizador complexa ou especializada, secagem por pulverizador congelada, processos com base em anti-solvente de fluido supercríticos ou processos de moagem (vide, por exemplo, Laube BL. The expanding role of aerosols in systemic drug delivery, gene therapy, and vaccination. Respir Care 2005; 50(9):1161-1176; Taylor G, Gumbleton M. Aerosols for Macromolecule Delivery: Design Challenges and Solutions. American Journal of Drug Delivery 2004; 2(3):143-155; Smyth HDC, Hickey AJ. Carriers in Drug Powder Delivery. Implications for Inhalation System Design. American Journal of Drug Delivery 2005; 3(2):117-132; Cryan SA. Carrier-based strategies for targeting protein and peptide drugs to the lungs. AAPS J 2005; 7(1):E20-E41; LiCalsi C, Maniaci MJ, Christensen T, Phillips E, Ward GH, Witham C. A powder formulation of measles vaccine for aerosol delivery. Vaccine 2001; 19(17-19):2629-2636; Maa YF, Prestrelski SJ. Biopharmaceutical powders: particle formation and formulation considerations. Curr Pharm Biotechnol 2000; 1(3):283-302; Maa YF, Nguyen PA, Hsu SW. Spray-drying of air-liquid interface sensitive recombinant human growth hormone. J Pharm Sci 1998; 87(2):152-159; Vanbever R, Mintzes JD, Wang J et al. Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation. Pharm Res 1999; 16(11):1735-1742; Bot Al, Tarara TE, Smith DJ, Bot SR, Woods CM, Weers JG. Novel lipid-based hollow-porous microparticles as a platform for immunoglobulin delivery to the respiratory tract. Pharm Res 2000; 17(3):275-283; Maa YF, Nguyen PA, Sweeney T, Shire SJ, Hsu CC. Protein inhalation powders: spray drying vs spray

freeze drying. Pharm Res 1999; 16(2):249-254; Sellers SP, Clark GS, Sievers RE, Carpenter JF. Dry powders of stable protein formulations from aqueous solutions prepared using supercritical CO(2)-assisted aerosolization. J Pharm Sci 2001; 90(6):785-797; Garcia-Contreras L, Morcol T, Bell SJ, Hickey AJ. Evaluation of novel particles as pulmonary delivery systems for insulin in rats. AAPS Pharm Sci 2003; 5(2):E9; Pfutzner A, Flacke F, Pohl R et al. Pilot study with technosphere/PTH(1-34)-a new approach for effective pulmonary delivery of parathyroid hormone (1-34). Horm Metab Res 2003; 35(5):319-323; Alcock R, Blair JA, O'Mahony DJ, Raoof A, Quirk AV. Modifying the release of leuprolide from spray dried OED microparticles. J Control Release 2002; 82(2-3):429-440; Grenha A, Seijo B, Remunan-Lopez C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. Eur J Pharm Sci 2005; 25(4-5):427-437; Edwards DA, Hanes J, Caponetti G et al. Large porous particles for pulmonary drug delivery. Science 1997; 276(5320):1868-1871; McKenna BJ, Birkedal H, Bartl MH, Deming TJ, Stucky GD. Micrometer-sized spherical assemblies of polypeptides and small molecules by acid-base chemistry. Angew Chem Int Ed Engl 2004; 43(42):5652-5655; Oh M, Mirkin CA. Chemically tailorable colloidal particles from infinite coordination polymers. Nature 2005; 438(7068): 651-654; Patente Norte-americana N°. 5.981.719; Patente Norte-americana N°. 5.849.884 e Patente Norte-americana N°. 6.090.925; Pedido de Patente Norte-americano N°. 20050234114; Patente Norte-americana N°. 6.051.256).

As micropartículas obtidas pelos métodos providos na presente invenção podem ser de qualquer formato e podem ter tamanhos (largura ou diâmetros médios) na faixa de aproximadamente ou em 0,001 micron a aproximadamente ou em 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5,

1,0, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 35,0, 40,0, 45,0 ou 50,0 micra ou mais. Para a administração pulmonar aos alvéolos, o tamanho pode ser de aproximadamente 0,1 micron ou menos a aproximadamente 0,5 micron. Para a administração pulmonar à garganta, à traquéia e aos brônquios, o tamanho pode estar de aproximadamente ou em 0,5 micron a aproximadamente ou em 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 ou 6,5 micra ou, em algumas realizações, de aproximadamente ou em 1,0 micron a aproximadamente ou em 2,0 micra. Em algumas realizações, as micropartículas são de formato substancialmente esférico.

As macromoléculas que podem ser utilizadas para formar micropartículas de acordo com os métodos providos na presente invenção podem incluir agentes terapêuticos e agentes de diagnóstico, alimentos processados, suplementos dietéticos e polímeros. Em algumas realizações, os agentes de reticulação, os sais ou outros compostos podem ser incluídos no coquetel da formulação para modificar a solubilidade das microesferas e/ou para intensificar sua força mecânica. Em algumas realizações, as microesferas que são insolúveis na maioria dos solventes aquosos ou orgânicos podem ser utilizadas para manufaturar partículas tais como resinas cromatográficas e abrasivos dispersíveis. Em outras realizações, as microesferas com solubilidade parcial nos solventes tais como veículos farmacêuticos para a aplicação podem ser úteis na manufatura do agente ativo de liberação prolongada ou formulações terapêuticas.

Em algumas realizações, as micropartículas providas na presente invenção podem ser utilizadas em combinação com um dispositivo de inalador para aplicar uma dose terapêutica de microesferas macromoleculares às vias respiratórias e aos pulmões de um indivíduo. Por exemplo, quando a macromolécula

é a proteína DAS181 (seqüência determinada na SEQ ID N°.: 17), as microesferas de aproximadamente 0,5 micron a aproximadamente 8 micra ou de aproximadamente 1 micron a aproximadamente 5 micra podem ser obtidas pelos métodos providos na presente invenção, utilizando o sulfato de sódio como o contraíon e o isopropanol como o solvente orgânico. Para as microesferas DAS181, que são administradas para impedir ou tratar as infecções virais que iniciam no trato respiratório, tal como o influenza, pode ser desejável depositar as microesferas na garganta, na traquéia ou nos brônquios. A proteína de fusão DAS181 formulada como microesferas pode agir ao degradar os ácidos siálicos do receptor na garganta/traquéia/brônquios, desse modo impedindo a ligação viral e a infecção nestes sítios. Para a aplicação mais favorável das microesferas DAS181 aos sítios onde a infecção viral respiratória pode ser iniciada, isto é, na garganta, na traquéia ou nos brônquios, as microesferas não devem ser (a) tão grandes que fiquem presas na extremidade anterior na boca (isto é, as microesferas são grandes demais, com aproximadamente 8 micra ou mais); ou (b) tão pequenas que sejam absorvidas profundamente nos pulmões e sejam sistemicamente absorvidas na corrente sanguínea através dos alvéolos onde não são ativas e/ou podem ser tóxicas (isto é, 0,5 micron ou menos). Para a aplicação das microesferas DAS181 à garganta, à traquéia e aos brônquios, uma faixa de tamanho de aproximadamente 1 micron a aproximadamente 5,5 - 6 micra geralmente pode ser apropriada.

O inalador pode ser utilizado para tratar qualquer condição médica em que a proteína ou outra macromolécula possa ser administrada pela terapia de inalação. Os dispositivos de inalador típicos podem incluir inaladores em pó secos, inaladores com medidor de dose e dispositivos de aplicação eletrostática. As aplicações típicas do aparelho de

aplicação incluem a aplicação profunda nos pulmões de insulina e de outras proteínas terapêuticas.

Em algumas realizações, as microesferas obtidas pelos métodos providos na presente invenção também podem ser aplicadas por meio de ingestão oral, intranasalmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutaneamente e por outros métodos de aplicação apropriados para a aplicação de moléculas terapêuticas. As formulações de microesfera para a aplicação pulmonar podem estar geralmente em uma faixa de tamanho de aproximadamente 0,5 micron a aproximadamente 5-6 micra, sendo que aquelas projetadas para outros tipos de aplicação, tais como a aplicação subcutânea, aplicação parenteral ou aplicação intramuscular podem estar em uma faixa de aproximadamente ou em 10 micra a aproximadamente ou em 30, 40 ou 50 micra.

Em algumas realizações, as microesferas providas na presente invenção não têm nenhum efeito terapêutico direto, mas podem servir como microportadores para outro(s) agente(s) terapêutico(s). Os exemplos de macromoléculas úteis para a preparação de tais microesferas incluem, mas não se limitam aos polissacarídeos, glicanos, proteínas, peptídeos, polímeros ou combinações destes. Os agentes terapêuticos ou outros agentes ativos podem ser adicionados quando da formação de microesfera ou ser adicionados à suspensão de microesferas formada. Alternativamente, os agentes terapêuticos podem ser misturados com as composições de microesfera secas por meio das técnicas de mistura, lavagem em tambor ou outras técnicas praticadas nas indústrias farmacêuticas e alimentícias.

Em algumas realizações, os agentes de reticulação, as substâncias lipofílicas, os sais tais como aqueles com solubilidade fraca em solventes aquosos ou as combinações destes ou outros compostos podem ser incluídos na solução de

coquetel da formulação para modificar a solubilidade das microesferas e/ou para intensificar sua força mecânica. A dissolução lenta das microesferas pode ser útil na liberação prolongada da terapêutica aplicada por meio de ingestão oral, inalação, intranasalmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutaneamente e por outros métodos de aplicação apropriados para a aplicação de moléculas terapêuticas. Em algumas realizações, as microesferas podem ser aplicadas por meio de ingestão oral em uma forma de uma pílula ou uma cápsula com um revestimento entérico, endocitosado a partir do duodeno, e a macromolécula é liberada na corrente sanguínea ou outro sítio de ação.

Em algumas realizações, as microesferas podem ser tornadas insolúveis pela desnaturação parcial da macromolécula, que quando da aplicação se torna novamente naturada e biodisponível.

Em outras realizações, as microesferas são substancialmente esféricas no formato e podem ter diâmetros médios dentro da faixa de aproximadamente 0,1 micron a 30,0 micra. Contudo, em outras realizações, o diâmetro médio das microesferas pode estar dentro da faixa de aproximadamente 0,5 micron a 5,0 micra ou de aproximadamente 1,0 micron a 2,0 micra.

Contudo, em um outro aspecto, são providos na presente invenção os dispositivos e os métodos para aplicar as microesferas a um indivíduo, tal como um paciente animal ou humano com necessidade de tratamento médico. As vias apropriadas de aplicação podem incluir a via parenteral, como i.m., i.v. e s.c. e não-parenteral, como oral, bucal, intratecal, nasal, pulmonar, transdermal, transmucosal e outros vias de aplicação similares. Os dispositivos de aplicação podem incluir seringas, com e sem agulha, e inaladores.

Os dispositivos de aplicação podem conter uma única dose de microesferas para tratar uma condição que seja tratável pela liberação rápida ou prolongada da macromolécula *in vivo*. O número das microesferas presentes na dose única é dependente do tipo e da atividade da macromolécula. A dose única pode ser selecionada para conseguir a liberação prolongada durante um período de tempo que foi otimizado para o tratamento da condição médica particular. Por exemplo, quando a macromolécula é a proteína de fusão DAS181 (SEQ ID N°.: 17), a dosagem de aplicação das composições de microesfera que contêm DAS181 pode ser entre aproximadamente 0,5 mg de proteína por dose a aproximadamente 100 mg de proteína por dose ou aproximadamente 0,75 mg, 1 mg, 1,5 mg, 2 mg, 3 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg ou 60 mg de proteína por dose.

O componente da macromolécula da microesfera pode ser qualquer molécula capaz de formar microesferas de acordo com os métodos providos na presente invenção. Em algumas realizações, a macromolécula é uma proteína, incluindo enzimas e proteínas recombinantes, peptídeos, carboidratos, polissacarídeos, conjugados de proteína-carboidrato ou de polissacarídeo-proteína, ácidos nucleicos, vírus, partículas de vírus, conjugados de moléculas pequenas (tais como um hapteno) e de proteínas ou misturas destes. Uma droga ou composto orgânico ou inorgânico farmacêutico natural ou sintético pode ser incorporado nas microesferas ao unir a droga a uma macromolécula, tal como uma proteína e então formar as microesferas a partir do complexo ou do conjugado de macromolécula-droga. Será compreendido pelos elementos versados na técnica que um composto incapaz de ter uma estrutura terciária e quaternária pode ser formado em um microesfera pela incorporação ou acoplamento do composto em uma molécula do portador que tenha uma estrutura terciária e

quaternária. Será compreendido adicionalmente pelos elementos versados na técnica que a macromolécula pode ser uma porção de uma molécula como, por exemplo, um peptídeo, um segmento de cordão único de uma molécula de cordão duplo do ácido
5 nucléico ou uma partícula de vírus ou outra macromolécula que tem uma estrutura terciária e quaternária.

O termo "macromolécula" também pode incluir uma pluralidade de macromoléculas e inclui combinações de macromoléculas diferentes tais como uma combinação de um
10 composto farmacêutico e de uma molécula de afinidade para alvejar o composto farmacêutico a um tecido, um órgão ou um tumor que requer tratamento. Uma molécula de afinidade pode ser, por exemplo, um ligando ou um receptor. Os exemplos de ligandos podem incluir vírus, bactérias, polissacarídeos ou
15 toxinas que podem agir como antígenos para gerar uma resposta imune quando administrados a um animal e causar a produção de anticorpos.

Em algumas realizações, a macromolécula é uma proteína terapêutica incluindo, mas não se limitando a uma
20 sialidase, uma proteína de fusão de sialidase, uma proteína de fusão que contém um domínio catalítico de sialidase fundido a um domínio de ligação de GAG, uma protease, um inibidor de protease, uma insulina, interferons, hormônio do crescimento humano, calcitonina, rhDNase ou hormônio da
25 paratireóide e o teor de proteína das microesferas pode estar de aproximadamente ou em 50% a aproximadamente ou em 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais. Para a administração pulmonar, as microesferas podem ter um tamanho médio na faixa de aproximadamente ou em 0,5
30 micron a aproximadamente ou em 5,0 micra e em algumas realizações, entre aproximadamente ou em 1 micron e aproximadamente ou em 2 micra.

Outras proteínas que podem ser utilizadas para

formar microesferas pelos métodos providos na presente invenção podem incluir, mas não se limitam a proteínas terapêuticas incluindo DAS181 (DAS181; SEQ ID N°. 17), al-
 antitripsina, Ecotin, eglina c, serpina, Pulmozyme (rhDNase),
 5 betaxololTM, diclofenacTM, doxorubicina, acetil cisteína, rifampinTM, acetato de leuprolide, hormônio de liberação do hormônio luteinizante (LHRH), (D-Tryp6)-LHRH, acetato de nafarelina, insulina, insulina de sódio, insulina de zinco, protamina, lisozima, alfa-lactalbumina, fator básico do
 10 crescimento de fibroblastos (bFGF), beta-lactoglobulina, tripsina, calcitonina, hormônio da paratireóide, anidrase carbônica, ovalbumina, albumina de soro bovino (BSA), albumina de soro humano (HSA), fosforilase b, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, IgG, fibrinogênio, poli-L-
 15 lisina, IgM, DNA, acetato de desmopressina, fator de liberação do hormônio do crescimento (GHRF), somatostatina, antide, fator VIII, G-CSF/GM-CSF, hormônio humano do crescimento (hGH), beta interferon, antitrombina III, alfa interferon, alfa interferon 2b.

20 Um dispositivo de inalador pode ser utilizado para aplicar uma proteína terapêutica tal como aquelas relacionadas acima ou outras microesferas com base em macromolécula às vias respiratórias e aos pulmões de um indivíduo. As microesferas de proteína podem ser preparadas,
 25 por exemplo, ao colocar em contato uma solução aquosa da proteína com um ácido carboxílico tal como o citrato ou o sulfato ou outro contraíon e um solvente orgânico tal como o isopropanol e refrigerar a solução para formar as microesferas. A proteína pode ser uma proteína, tal como uma
 30 sialidase, um inibidor terapêutico de protease, uma insulina, hormônio humano do crescimento, calcitonina, rhDNase ou do hormônio da paratireóide, e o teor de proteína das microesferas pode estar em aproximadamente ou em 70% a

aproximadamente ou em 90% ou mais, 95% ou mais ou pelo menos aproximadamente 99% ou mais. Para a administração pulmonar, as microesferas, por exemplo, as microesferas DAS181, podem ser feitas sob medida para ter um diâmetro médio na faixa de
5 aproximadamente 0,5 micron a 5,0 micra ou entre aproximadamente 1 micron a aproximadamente 2 micra.

As condições de incubação para formar as microesferas podem ser otimizadas para incorporar pelo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,
10 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou mais da quantidade total de macromolécula presente na solução antes da formação das microesferas, ajustando parâmetros incluindo o pH, a temperatura, a concentração da macromolécula ou a duração da reação ou a incubação.

Em algumas realizações, uma molécula ou composto
15 que não produza microesferas de características desejáveis pode ser incorporado nas microesferas que têm características desejáveis, por exemplo, de tamanho, perfil de aplicação, força mecânica, pela incorporação ou acoplamento do composto
20 com uma molécula do portador que possa formar microesferas com características desejáveis. Em algumas realizações, a macromolécula do portador é uma proteína, e a molécula ou o composto é ligado dentro e/ou na superfície da microesfera. Em algumas realizações, a molécula ou composto também pode
25 servir como o contraíon e iniciar e/ou facilitar a formação das microesferas.

Ao preparar as microesferas que contêm uma proteína, um estabilizador da proteína tal como o glicerol, os ácidos graxos, os açúcares tais como a sacarose, os íons
30 tais como o zinco, o cloreto de sódio ou todos os outros estabilizadores de proteína conhecidos pelos elementos versados na técnica podem ser adicionados antes de refrigerar o coquetel durante a formação de microesfera para minimizar a

desnaturação da proteína.

Em algumas realizações, as microesferas podem ser adicionalmente revestidas na superfície com moléculas apropriadas e/ou agentes de revestimento, tais como aquelas que emprestam a resistência aos ácidos, tais como os ácidos digestivos ou as proteases. Em outras realizações, as microesferas podem ser revestidas de modo não-covalente com os compostos tais como os ácidos graxos ou lipídeos. O revestimento pode ser aplicado às microesferas pela imersão na substância de revestimento solubilizada, pulverizando então as microesferas com a substância ou utilizando outros métodos conhecidos pelos elementos versados na técnica. Em algumas realizações, os ácidos graxos ou os lipídeos são adicionados diretamente à solução de coquetel de formação de microesfera.

A formação das microesferas ao diminuir a temperatura pode ser executada por uma variedade de métodos convencionais em batelada ou em modos contínuos. A formação de microesfera pode ser adicionalmente provocada por outros métodos incluindo, mas não se limitando à modulação da pressão atmosférica, expansão da força G ou da superfície, incluindo a semeadura. A formação de microesfera pode ocorrer imediatamente quando da exposição a estas condições ou pode requerer um período de tempo prolongado como provido na presente invenção.

Proteínas

As proteínas exemplificadoras que podem ser utilizadas para formar micropartículas pelos métodos providos na presente invenção são descritas abaixo.

Sialidases

Sialidases, também denominada como neuraminidases e N-acilneuraminosilglicoidrolases, são as exoglicosidases de uma família que catalisa a remoção de resíduos de ácido

siálico terminais de sialo-glicoconjugados. Os ácidos siálicos são uma família de ácidos α -ceto com as cadeias principais de 9 carbonos que são encontradas geralmente nas posições mais externas das cadeias de oligossacarídeo unidas às glicoproteínas e aos glicolipídeos. Estas moléculas são envolvidas em uma variedade de funções e processos biológicos, tais como a regulação da imunidade inata, a aderência celular e a interação entre as células e as células alvo, possivelmente mediados através da ligação de várias lectinas (Varki et al. (1992) Curr Opin Cell Biol. 4:257-266). Os ácidos siálicos são também excelentes fontes de carbono, nitrogênio, energia e os precursores da biossíntese da parede celular. Além disso, os ácidos siálicos nas células eucarióticas podem ser utilizados como os receptores ou os co-receptores para microorganismos patogênicos, incluindo, mas não se limitando ao vírus influenza, vírus parainfluenza, alguns coronavírus e rotavírus, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Helicobacter pylori* e *Pseudomonas aeruginosa*. O elemento mais proeminente da família do ácido siálico é o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), que é o precursor biossintético para a maioria dos outros tipos. Dois enlaces principais entre Neu5Ac e os penúltimos resíduos de galactose das cadeias laterais do carboidrato são encontrados na natureza, Neu5Ac $\alpha(2,3)$ -Gal e Neu5Ac $\alpha(2,6)$ -Gal. Ambas as moléculas Neu5Ac $\alpha(2,3)$ -Gal e Neu5Ac $\alpha(2,6)$ -Gal podem ser reconhecidas pelo vírus influenza e ser utilizadas como o receptor através do qual o vírus se liga e inicia a infecção. Os vírus humanos do influenza, no entanto, parecem preferir o Neu5Ac $\alpha(2,6)$ -Gal, sendo que os vírus aviários e eqüinos do influenza reconhecem predominantemente o Neu5Ac $\alpha(2,3)$ -Gal (Ito et al. (2000) Microbiol Immunol 44:423-730). O epitélio respiratório humano expressa ambas as formas de ácidos

siálicos, mas o ácido siálico ligado a $\alpha(2,6)$ é mais abundante do que o ácido siálico ligado a $\alpha(2,3)$. A baixa abundância de ácido siálico ligado a $\alpha(2,3)$ é mais provavelmente a base para a barreira da espécie para o vírus aviário e indica que a redução do nível de um ácido siálico do receptor expresso no epitélio das vias respiratórias reduziria provavelmente a infectividade de um vírus influenza. Desse modo, as sialidases, que removem os resíduos de ácido siálico terminais dos sialo-glicoconjugados, apresentam-se como os agentes terapêuticos do vírus influenza potenciais que funcionam para reduzir os níveis de ácidos siálicos do receptor. As sialidases também podem agir como agentes terapêuticos para todos os outros patógenos que utilizam ácidos siálicos no processo da infecção incluindo, mas não se limitando a *M. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. pylori*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, vírus parainfluenza e alguns coronavírus e rotavírus.

As sialidases tendem a ser substratos altamente específicos. Podem alvejar tipos particulares de moléculas complexas, tais como glicoproteínas ou glicolipídeos; enlaces de açúcar específicos (por exemplo, 2-3, 2-6 ou 2-8); ou podem ser sensíveis à natureza do próprio enlace do açúcar (por exemplo, D-galactose, N-acetil-D-galactosamina). As moléculas do substrato incluem, mas não são limitadas a oligossacarídeos, polissacarídeos, glicoproteínas, gangliosídeos e moléculas sintéticas. Por exemplo, uma sialidase pode clivar as ligações que têm enlaces $\alpha(2,3)$ -Gal, $\alpha(2,6)$ -Gal ou $\alpha(2,8)$ -Gal entre um resíduo de ácido siálico e o restante de uma molécula do substrato. Uma sialidase também pode clivar alguns ou todos os enlaces entre o resíduo de ácido siálico e o restante da molécula do substrato. Muitas proteínas de sialidase foram purificadas a partir dos micróbios e eucariotas superiores e destes, diversos foram

mostrados para catalisar a remoção de resíduos ácidos siálicos terminais que podem servir como os receptores para microorganismos patogênicos. Por exemplo, entre as sialidases bacterianas grandes estão aquelas que podem degradar os ácidos siálicos do receptor do influenza Neu5Ac α (2,6)-Gal e Neu5Ac α (2,3)-Gal, incluindo as sialidases *Clostridium perfringens*, *Actinomyces viscosus*, *Arthrobacter ureafaciens*, e *Micromonospora viridifaciens*. Outras sialidases que podem servir como os agentes terapêuticos incluem as sialidases humanas, tais como aquelas codificadas pelos genes NEU2 e NEU4.

Proteínas de fusão de GAG-Sialidase

As proteínas de fusão de GAG-sialidase são as proteínas que são compostas de uma proteína de sialidase ou porção cataliticamente ativa desta, fundidas a uma seqüência de ligação de GAG ao glicosaminoglicano. Como tais, estas proteínas contêm eficazmente um domínio de ancoragem (a seqüência de ligação de GAG) e um domínio terapêutico (a proteína de sialidase ou a porção cataliticamente ativa desta). As proteínas de fusão de GAG-sialidase são projetadas para se ligar ao epitélio e remover os ácidos siálicos circunvizinhos e podem, portanto, ser utilizadas como um agente terapêutico contra os patógenos que utilizam ácidos siálicos no processo da infecção. A capacidade de a proteína de fusão se ligar ao epitélio aumenta sua retenção quando a proteína de fusão é administrada, por exemplo, como um inalante para tratar a infecção por influenza. A seqüência de ligação de GAG age como um domínio de ancoragem do epitélio que amarra a sialidase ao epitélio respiratório e aumenta sua retenção e potência.

O sulfato de heparana, intimamente relacionado à heparina, é um tipo de glicosaminoglicano (GAG) que está ubiquamente presente nas membranas da célula, incluindo a

superfície do epitélio respiratório. Muitas proteínas se ligam especificamente ao sulfato de heparina/heparana e as seqüências de ligação de GAG nestas proteínas foram identificadas. Por exemplo, foi mostrado que as seqüências de

5 ligação de GAG do fator de plaquetas humanas 4 (PF4) (SEQ ID N°.: 3), interleucina humana 8 (IL8) (SEQ ID N°.: 4), antitrombina humana III (AT III) (SEQ ID N°.: 5), apoproteína humana E (ApoE) (SEQ ID N°.: 6), proteína de célula migratória angio-associada humana (AAMP) (SEQ ID N°.: 7) ou

10 anfirregulina humana (SEQ ID N°.: 8) exibem afinidade elevada para a heparina (Lee et al. (1991) PNAS 88:2768-2772; Goger et al.. (2002) Biochem. 41:1640-1646; Witt et al. (1994) Curr Bio 4:394-400; Weisgraber et al. (1986) J Bio Chem 261:2068-2076). As seqüências de ligação de GAG destas proteínas são

15 distintas de suas seqüências de ligação ao receptor, então não induzem as atividades biológicas associadas com as proteínas de comprimento cheio ou os domínios de ligação ao receptor. Estas seqüências ou outras seqüências que podem se ligar ao sulfato de heparina/heparana podem ser utilizadas

20 como domínios de ancoragem do epitélio nas proteínas de fusão de GAG-sialidase.

No contexto de uma proteína de fusão de GAG-sialidase, a sialidase pode incluir a proteína de sialidase inteira ou uma porção cataliticamente ativa desta. Por

25 exemplo, a proteína de fusão de GAG-sialidase pode conter a proteína de sialidase do aminoácido 901 de *A. viscosus* determinada na SEQ ID N°.: 1. Em um outro exemplo, proteína de fusão de GAG-sialidase pode conter as 394 porções cataliticamente ativas do aminoácido de uma proteína de

30 sialidase de *A. viscosus* determinada na SEQ ID N°.: 2. A seqüência de ligação de GAG pode ser ligada à sialidase por métodos recombinantes. Em alguns exemplos, a proteína de fusão pode incluir um ligante do aminoácido, tal como quatro

resíduos de glicina. Além disso, o enlace pode se dar através do N- ou C-término da sequência de ligação de GAG ou o N- ou C-término da sialidase. Os exemplos exemplificadores de proteínas de fusão de GAG-sialidase incluem aqueles polipeptídeos determinados nas SEQ ID N°. : 9-13 e 17. Em um exemplo adicional, a sialidase e os componentes de ligação de GAG da sequência podem ser ligados utilizando ligantes químicos ou do peptídeo, por meio de qualquer método conhecido no estado da técnica.

Inibidor de proteinase

O inibidor de proteinase 8 (PI8), também conhecido como Serpina B8, é um inibidor de protease de serina (serpina). As serpinas são uma grande superfamília de proteínas estruturalmente relacionadas que são expressas nos vírus, nos insetos, nas plantas e em organismos superiores, mas não nas bactérias ou leveduras. As serpinas regulam a atividade das proteases envolvidas em vários processos biológicos, incluindo a coagulação, a fibrinólise, a inflamação, a migração de células e a tumorigênese. Contêm um laço de sítio reativo exposto na superfície (RSL), que age como uma "isca" para as proteases ao simular uma sequência do substrato da protease. Na ligação da protease alvo à serpina, o RSL é clivado, depois do que a protease é ligada de modo covalente à serpina. A protease no complexo de serpina/protease recém-formado é inativa (Huntington et al (2000) Nature 407:923-926).

O PI8 é um elemento de uma subfamília de serpinas das quais a ovalbumina da galinha é o arquétipo. Como outras serpinas que pertencem a esta família, o PI8 não tem uma sequência de sinal de N-terminal clivável típica, tendo por resultado uma proteína do aminoácido 374 (SEQ ID N°. : 14) que reside principalmente intracelularmente. Outros elementos desta subfamília similar a ovalbumina humana incluem o

inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 2 (PAI-2), inibidor da elastase de neutrófilo de monócito (MNEI), antígeno do carcinoma celular escamoso (SCCA)-1, leupina (SCCA)-2, maspina (PI5), inibidor de protease 6 (PI6),
 5 inibidor de protease (PI9) e bomapina (PI10). Dentro desta família, as serpinas PI6, PI8 e PI9 mostram a homologia estrutural mais elevada (identidade do aminoácido de até 68%) (Sprecher et al. (1995) J Biol Chem 270:29854-29861). Foi
 10 mostrado que o PI-8 inibe a tripsina, a trombina, o fator Xa, a subtilisina A, a furina e também a quimiotripsina *in vitro*. É liberado pelas plaquetas e parece estar envolvido na regulação da atividade da furina e, portanto, na agregação plaquetária (LeBlond et al. (2006) Thromb Haemost 95:243-252).

15 Além de seu papel na regulação de processos biológicos endógenos, tais como a coagulação, os inibidores de protease de serina também podem funcionar para inibir as atividades biológicas de microorganismos exógenos. Por exemplo, foi mostrado que um número de inibidores de protease
 20 de serina reduz a ativação do vírus influenza em células cultivadas, embriões de galinha e nos pulmões de ratos infectados. As serpinas se ligam às moléculas de hemaglutinina (HA) na superfície do vírus influenza e inibem sua atividade, reduzindo desse modo a infectividade do vírus.
 25 Por exemplo, inibidores de tripsina, como: aprotinina (Zhimov et al. (2002) J Virol 76:8682-8689), leupeptina (Zhimov et al. (2002) J Virol 76:8682-8689; Tashiro et al. (1987) J Gen Virol 68:2039-2043), inibidor da protease da soja (Barbey-Morel et al. (1987) J Infect Dis 155:667-672),
 30 ácido e-aminocapróico (Zhimov et al.. 1982. Arch Virol 73:263-272) e n-p-tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK) (Barbey-Morel et al. (1987) J Infect Dis 155:667-672), sendo que todos estas inibiram a infecção pelo vírus influenza e

são agentes terapêuticos candidatos para a utilização no tratamento da infecção pelo vírus influenza. Desse modo, como um inibidor relacionado à tripsina, o PI8 também pode ser utilizado como um agente terapêutico no tratamento da
5 infecção pelo vírus influenza.

Agentes Ativos de Superfície

As composições providas na presente invenção podem conter um ou mais agentes ativos de superfície que são adicionados em uma quantidade suficiente para formar uma
10 emulsão estável. A quantidade de agente ativo de superfície apropriada é uma função da proteína não-desnaturada, opcionalmente agentes ativos adicionais para a aplicação e outros componentes presentes na emulsão, uma vez que alguns agentes podem ter propriedades auto-emulsificantes e outros
15 agentes e componentes afetam a tensão de superfície.

Os agentes ativos de superfície para a utilização na presente invenção são as substâncias que, quando dissolvidas em uma solução aquosa, reduzem a tensão de superfície da solução ou a tensão interfacial entre a fase
20 aquosa e a fase de óleo, para formar um óleo estável em água ou emulsão de água em óleo. As moléculas de tensoativo são anfifílicas e contêm grupos principais hidrofílicos e caudas hidrofóbicas. As moléculas de tensoativo formam várias estruturas macromoleculares em uma emulsão, tal como micelas,
25 micelas inversas, bicamadas de lipídeo (lipossomos) e cubossomos. A estrutura macromolecular exata que é formada depende dos tamanhos relativos das regiões hidrofílicas e hidrofóbicas da molécula ativa de superfície. Em determinadas realizações, o agente ativo de superfície é selecionado entre
30 o lauril sulfato de sódio; laurato de sorbitano, palmitato de sorbitano, estearato de sorbitano (disponível sob o nome comercial Span® 20-40-60 etc.); polissorbatos tais como o monolaurato de sorbitano de polioxietileno (20),

monopalmitato de sorbitano de polioxietileno (20),
 monoestearato de sorbitano de polioxietileno (20) (disponível
 sob o nome comercial TWEENS® 20-40-60 etc.); cloreto de
 benzalcônio, fosfolipídeos de cadeia mista, lipídeos
 5 catiônicos, oligolipídeos, fosfolipídeos, carnitinas,
 esfingosinas, esfingomielinas, ceramidas, glicolipídeos,
 lipoproteínas, apoproteínas, proteínas anfifílicas, peptídeos
 anfifílicos, polímeros sintéticos anfifílicos e combinações
 destes. Outros agentes ativos de superfície exemplificadores
 10 para a utilização na presente invenção incluem, mas não são
 limitados a

i) Lipídeos naturais, isto é, Colesterol,
 Esfingosina e Derivados, Gangliosídeos, derivados de
 Esfingosina (soja), Fitoesfingosina e derivados (Leveduras),
 15 Colina (fosfatidilcolina), etanolamina
 (Fosfatidiletanolamina), Glicerol (Fosfatidil-DL-glicerol),
 Inositol (Fosfatidilinositol), Serina (Fosfatidilserina (Sal
 de Sódio)), Cardiolipina, Ácido Fosfatídico, Derivado de Ovo,
 Derivados de Liso (Mono Acila) (Lisofosfatídeos),
 20 Fosfolipídeos Hidrogenados, Extratos de Tecido de Lipídeo,

ii) Lipídeos sintéticos, isto é, Ácido Graxo
 Assimétrico, Ácido Graxo Simétrico - Série Saturada, Ácido
 Graxo Simétrico - Série Insaturada, Acil Coenzima A (Acetoil
 Coenzima A, Butanoil Coenzima A, Crotanoil Coenzima A,
 25 Hexanoil Coenzima A, Octanoil Coenzima A, Decanoil Coenzima
 A, Lauroil Coenzima A, Miristoil Coenzima A, Palmitoil
 Coenzima A, Estearoil Coenzima A, Oleoil Coenzima A,
 Araquidoil Coenzima A, Araquidonoil Coenzima A, Beenoil
 Coenzima A, Tricosanoil Coenzima A, Lignoceroil Coenzima A,
 30 Nervonoil Coenzima A, Hexacosanoil Coenzima A,

iii) Esfingolipídeos, isto é, Derivados de D-eritro
 (C-18) (Esfingosina, como: Esfingosina de D-eritro
 (sintética), Esfingosina-1-Fosfato, N,N-Dimetilesfingosina,

N,N,N-Trimetilesfingosina, Esfingosilfosforilcolina,
 Esfingomielina e Esfingosina Glicosilada), Derivados de
 ceramida (Ceramidas, D-eritro Ceramida-1-Fosfato, Ceramidas
 Glicosiladas), Esfinganina (Diidroesfingosina) (Esfinganina-
 5 1-Fosfato, Esfinganina (C20), D-eritro Esfinganina, N-Acil-
 Esfinganina C2, N-Acil-Esfinganina C8, N-acil-Esfinganina
 C16, N-Acil-Esfinganina C18, N-Acil-Esfinganina C24, N-Acil-
 Esfinganina C24:1), Esfingosina (C18) e Derivados de
 Fosfolipídio (Glicosilados - Esfingosina) (Esfingosina, β D-
 10 Glucosil, Esfingosina, β D-Glucosil, Esfingosina, β D-
 Lactosil), Glicosilados - Ceramida (D-Glucosil- β 1-1'
 Ceramida (C8), D-Galactosil- β 1-1' Ceramida (C8), D-Glucosil-
 β 1-1' Ceramida (C12), D-Galactosil- β 1-1' Ceramida (C12), D-
 Lactosil- β 1-1' Ceramida (C12)), Glicosilados -
 15 Fosfatidiletanolamina (1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-
 Fosfoetanolamina-N-Lactose), Derivados de D-eritro (C17) (D-
 eritro Esfingosina, D-eritro Esfingosina-1-fosfato),
 Derivados de D-eritro (C20) (D-eritro Esfingosina), Derivados
 de L-treo (C18) (L-treo Esfingosina, Safingol (L-treo
 20 Diidroesfingosina)), Derivados de Esfingosina (Ovo, Cérebro &
 Leite) (D-eritro-Esfingosina, Esfingomielina, Ceramidas,
 Cerebrosídeos, Sulfatídeos Cerebrais), Gangliosídeos
 (Estruturas de Gangliosídeos, Gangliosídeos - Cérebro Ovino,
 Gangliosídeos Glicosilados - Cérebro Suíno), Derivados de
 25 Esfingosina (Soja) (Glucosilceramida), Derivados de
 Fitoesfingosina (Leveduras) (Fitoesfingosina, D-ribo-
 Fitoesfingosina-1-Fosfato, N-Acil Fitoesfingosina C2, N-Acil
 Fitoesfingosina C8, N-Acil Fitoesfingosina C18,
 iv) Acil Coenzima A, isto é, Acetoil Coenzima A
 30 (Sal de Amônio), Butanoil Coenzima A (Sal de Amônio),
 Crotonoil Coenzima A (Sal de Amônio), Hexanoil Coenzima A
 (Sal de Amônio), Octanoil Coenzima A (Sal de Amônio),
 Decanoil Coenzima A (Sal de Amônio), Lauroil Coenzima A (Sal

de Amônio), Miristoil Coenzima A (Sal de Amônio), Palmitoil Coenzima A (Sal de Amônio), Estearoil Coenzima A (Sal de Amônio), Oleoil Coenzima A (Sal de Amônio), Araquidoil Coenzima A (Sal de Amônio), Araquidonoil Coenzima A (Sal de Amônio), Beenoil Coenzima A (Sal de Amônio), Tricosanoil Coenzima A (Sal de Amônio), Lignoceroil Coenzima A (Sal de Amônio), Nervonoil Coenzima A (Sal de Amônio), Hexacosanoil Coenzima A (Sal de Amônio), Docosahexaenoil Coenzima A (Sal de Amônio),

10 v) Lipídeos oxidados, isto é, 1-Palmitoil-2-Azelaoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina, 1-O-Hexadecil-2-Azelaoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina, 1-Palmitoil-2-Glutaroil-sn-Glicero-3-Fosfocolina (PGPC), 1-Palmitoil-2-(9'-oxo-Nonanoil)-sn-Glicero-3-Fosfocolina, 1-Palmitoil-2-(5'-oxo-Valeroil)-sn-Glicero-3-Fosfocolina,

5 vi) Lipídeos de éter, isto é: Lipídeos de Diéter (Dialquil Fosfatidilcolina, Lipídeos de Difitanil Éter), Alquil Fosfocolina (Dodecilmfosfocolina), O-Alquil Diacilfosfatidilcolínio (1,2-Diacil-sn-Glicero-3-Etilfosfocolina), PAF Sintético & Derivados (1-Alquil-2-Acil-Glicero-3-Fosfocolina & Derivados),

20 vii) Lipídeos fluorescentes, isto é: com Base em Glicerol (Fosfatidilcolina (NBD), Ácido Fosfatídico (NBD), Fosfatidiletanolamina (NBD), Fosfatidilglicerol (NBD), Fosfatidilserina (NBD)), com Base em Esfingosina (Ceramida (NBD), Esfingomielina (NBD), Fitoesfingosina (NBD), Cerebrosídeo de Galactosila (NBD)), Lipídeos Etiquetados do Grupo Principal (com Base em Glicerol) (Fosfatidiletanolamina (NBD), Fosfatidiletanolamina (Rodamina de Lissamina B),

25 Dioleoil Fosfatidiletanolamina (Dansila, Pirena, Fluoresceína), Fosfatidilserina (NBD), Fosfatidilserina (Dansila)), 25-NBD-Colesterol,

viii) Outros lipídeos incluindo, mas não se

limitando à lecitina, Ultralec-P (ADM), Soja em pó,

ix) Tensoativos incluindo, mas não se limitando a polietileno glicol 400; lauril sulfato de sódio; laurato de sorbitano, palmitato de sorbitano, estearato de sorbitano (disponível sob o nome comercial Span® 20-40-60 etc.); polissorbatos tais como o monolaurato de sorbitano de polioxietileno (20), monopalmitato de sorbitano de polioxietileno (20), monoestearato de sorbitano de polioxietileno (20) (disponível sob o nome comercial TWEENS® 20-40-60 etc.); cloreto de benzalcônio.

Em determinadas realizações, os fosfolipídeos para a utilização são fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas, fosfatidilgliceróis, fosfatidilinositóis, ácidos fosfatídicos, fosfolipídeos de cadeia mista, lisofosfolipídeos, fosfolipídeos hidrogenados, fosfolipídeos parcialmente hidrogenados e misturas destes.

Em determinadas realizações, o agente ativo de superfície é selecionado entre polissorbato-80, lecitina e fosfatidilcolina. Os agentes ativos de superfície estão presentes em uma quantidade suficiente para formar uma emulsão estável.

A quantidade do agente ativo de superfície pode ser empiricamente determinada e é uma função do agente selecionado e da forma desejada da composição resultante. A quantidade incluída pode ser de menos de 0,1% em peso até 35% ou mais. Em determinadas realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25% em peso até aproximadamente 30% em peso do peso total da composição. Em determinadas realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 1% em peso até aproximadamente 20% em peso do peso total da composição. Em determinadas realizações, o

agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 1% em peso até aproximadamente 15% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 1% em peso até aproximadamente 10% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 1% em peso até aproximadamente 8% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 1% em peso até aproximadamente 6% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 1% em peso até aproximadamente 4% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 20% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 15% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 13% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 11% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 8% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 6% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 4% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está

presente a uma concentração de aproximadamente 2% em peso do peso total da composição. Em outras realizações, o agente ativo de superfície está presente a uma concentração de aproximadamente 1% em peso do peso total da composição.

5 As emulsões estáveis providas na presente invenção podem conter um ou mais veículos de aplicação selecionados entre micelas, lipossomos e cubossomos e misturas destes ou os conjuntos macromoleculares de proteínas não-desnaturadas tais como tubos, hélices, esferas e outros ainda, que podem
10 encapsular nutrientes adicionais ou agentes ativos. Os veículos de aplicação que encapsulam o agente ativo são então absorvidos no epitélio onde as proteínas não-desnaturadas e/ou os agentes ativos/nutrientes adicionais são aplicados.

Agentes adicionais opcionais

5 As composições providas na presente invenção podem opcionalmente conter, além das proteínas não-desnaturadas, um ou mais agentes farmacêuticos ou nutracêuticos ou outros tais agentes para a ingestão por um indivíduo. Geralmente, os agentes são aqueles que têm uma função em um hospedeiro, por
20 exemplo, regulação imune, regulação de processos bioquímicos ou atividade enzimática. Qualquer agente que pode ser formulado como descrito na presente invenção pode ser administrado nas composições providas na presente invenção. Onde o agente é terapêutico, as composições contêm uma
25 quantidade terapeuticamente eficaz de um agente a ser aplicado. A quantidade particular de agente ativo em uma dosagem irá variar extensamente de acordo com a natureza do agente ativo, a natureza da condição que está sendo tratada, a idade e o tamanho do indivíduo e outros parâmetros.

30 Geralmente, a quantidade de agente ativo ou de nutriente adicional além das proteínas não-desnaturadas na composição irá variar menos do que aproximadamente 0,01% em peso a aproximadamente 20% em peso da composição ou mais e

será formulada tipicamente para uma administração de dosagem única. Uma dosagem única pode variar de aproximadamente 0,01 µg a 10 mg de um agente por quilograma de peso corpóreo do hospedeiro, sendo que dosagens de aproximadamente 0,1 µg a 1 mg/kg são geralmente empregadas. Estas concentrações, no entanto, são somente diretrizes gerais e quantidades e dosagens particulares podem ser selecionadas com base no agente ativo que está sendo administrado, na condição a ser tratada, e o regime de tratamento que é empregado significa uma quantidade de uma droga ou de um agente ativo que é suficiente para prover o efeito desejado e o desempenho local ou sistêmico em uma relação razoável de risco/benefício a um indivíduo que passa por qualquer tratamento médico.

Os agentes podem ser selecionados a partir das drogas inorgânicas e orgânicas incluindo, mas não se limitando às drogas que agem nos nervos periféricos, receptores adrenérgicos, receptores colinérgicos, sistema nervoso, músculos esqueléticos, sistema cardiovascular, músculos lisos, sistema circulatório do sangue, sítios sinápticos, sítios juncionais neuroefetores, sistema endócrino, sistemas hormonais, sistema imunológico, sistema reprodutor, sistema esquelético, sistemas autocóides, sistemas digestório e excretório, sistemas histamínicos e outros ainda. Os agentes ativos que podem ser aplicados utilizando as composições providas na presente invenção incluem, mas não são limitados a anticonvulsivantes, analgésicos, antiparkinsonianos, antiinflamatórios, antagonistas de cálcio, anestésicos, antimicrobianos, antimaláricos, antiparasíticos, anti-hipertensivos, anti-histamínicos, antipiréticos, agonistas alfa-adrenérgicos, alfa-bloqueadores, biocidas, bactericidas, dilatadores brônquicos, drogas de obstrução beta-adrenérgica, contraceptivos, drogas cardiovasculares, inibidores do canal de cálcio,

antidepressivos, agentes de diagnóstico, diuréticos, eletrólitos, enzimas, hipnóticos, hormônios, hipoglicêmicos, hiperglicêmicos, constritores musculares, relaxantes musculares, neoplásticos, glicoproteínas, nucleoproteínas, lipoproteínas, oftálmicos, energizantes psíquicos, sedativos, esteróides, simpatomiméticos, parassimpatomiméticos, tranqüilizantes, drogas do trato urinário, vacinas, drogas vaginais, vitaminas, minerais, drogas antiinflamatórias não-esteroidais, enzimas de conversão de angiotensina, polinucleotídeos, polipeptídeos, polissacarídeos e suplementos nutritivos incluindo os suplementos herbais.

O nível do agente a ser aplicado é de aproximadamente 0,01 % até aproximadamente 50%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 40%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 30%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 20%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 10%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 9%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 8%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 7%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 6%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 5%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 4%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 3%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 2%, de aproximadamente 0,1% até aproximadamente 1% em peso da composição. O agente a ser aplicado pode ser solúvel em água, ligeiramente solúvel em água ou solúvel em óleo. Em determinadas realizações, o agente a ser aplicado é selecionado entre os anticonvulsivantes, analgésicos, antiparkinsonianos, antiinflamatórios, antagonistas de cálcio, anestésicos, antimicrobianos, antimaláricos, antiparasíticos, anti-hipertensivos, anti-histamínicos,

antipiréticos, agonistas alfa-adrenérgicos, alfa-bloqueadores, biocidas, bactericidas, dilatadores brônquicos, drogas de obstrução beta-adrenérgica, contraceptivos, drogas cardiovasculares, inibidores do canal de cálcio, antidepressivos, agentes de diagnóstico, diuréticos, eletrólitos, enzimas, hipnóticos, hormônios, hipoglicêmicos, hiperglicêmicos, constritores musculares, relaxantes musculares, neoplásticos, glicoproteínas, nucleoproteínas, lipoproteínas, proteína do soro de leite não-desnaturada, oftálmicos, energizantes psíquicos, sedativos, esteróides, simpatomiméticos, parassimpatomiméticos, tranqüilizantes, drogas do trato urinário, vacinas, drogas vaginais, vitaminas, minerais, drogas antiinflamatórias não-esteroidais, enzimas de conversão de angiotensina, polinucleotídeos, polipeptídeos, polissacarídeos e suplementos nutritivos incluindo os suplementos herbais.

Em determinadas realizações, o agente ativo é selecionado como segue:

Agonistas α -adrenérgicos tais como Adrafinil, Adrenolone, Amidephrine, Apraclonidine, Budralazine, Clonidine, Cyclopentamine, Detomidine, Dimetofrine, Dipivefrin, Ephedrine, Epinephrine, Fenoxazoline, Guanabenz, Guanfacine, Hydroxyamphetamine, Ibopamine, Indanazoline, Isometheptene, Mephentermine, Metaraminol, Methoxamine Hydrochloride, Methylhexaneamine, Metizolene, Midodrine, Naphazoline, Norepinephrine, Norfenefrine, Octodrine, Octopamine, Oxymetazoline, Phenylephrine Hydrochloride, Phenylpropanolamine Hydrochloride, Phenylpropylmethylamine, Pholedrine, Propylhexedrine, Pseudoephedrine, Rilmenidine, Synephrine, Tetrahydrozoline, Tiamenidine, Tramazoline, Tuaminoheptane, Tymazoline, Tyramine e Xylometazoline;

Agonistas β -adrenérgicos tais como Albuterol, Bambuterol, Bitolterol, Carbuterol, Clenbuterol,

Clorprenaline, Denopamine, Dioxethedrine, Dopexamine, Ephedrine, Epinephrine, Etafedrine, Ethylnorepinephrine, Fenoterol, Formoterol, Hexoprenaline, Ibopamine, Isoetharine, Isoproterenol, Mabuterol, Metaproterenol, Methoxyphenamine, 5 Oxyfedrine, Pirbuterol, Prenalterol, Procaterol, Protokylol, Reproterol, Rimiterol, Ritodrine, Soterenol, Terbuterol e Xamoterol;

α -bloqueadores adrenérgicos tais como Amosulalol, Arotinolol, Dapiprazole, Doxazosin, Ergoloid Mesylates, 10 Fenspiride, Indoramin, Labetalol, Nicergoline, Prazosin, Terazosin, Tolazoline, Trimazosin e Yohimbine;

Bloqueadores β -adrenérgicos tais como Acebutolol, Alprenolol, Amosulalol, Arotinolol, Atenolol, Befunolol, Betaxolol, Bevantolol, Bisoprolol, Bopindolol, Bucumolol, 15 Befetolol, Bufuralol, Bunitrolol, Bupranolol, hydrochloride de Butidrine, Butofilolol, carazolol, Carteolol, Carvedilol, Celiprolol, Cetamolol, Cloranolol, Dilevalol, Epanolol, Esmolol, Indenolol, Labetalol, Levobunolol, Mepindolol, Metipranalol, Metoprolol, Moprolol, Nadoxolol, Nifenalol, 20 Nipradilol, Oxprenolol, Penbutolol, Pindolol, practolol, Pronethalol, propranolol, Sotalol, Sulfinalol, Talinolol, Tertatolol, timolol, Toliprolol e Xibenolol;

Impedidores de álcool tais como Calcium Cyanamide Citrated, Disulfiram, Nadide e Nitrefazole;

25 Inibidores da reductase de aldose tais como Epalrestat, Ponalrestat, Sorbinil e Tolrestat;

Anabólicos tais como Androisoxazole, Androstenediol, Bolandiol, Bolasterone, Clostebol, Ethylestrenol; Formyldienolone, 4-Hydroxy-19-nortestosterone, 30 Methandriol, Methenolone, Methyltrienolone, Nandrolone, Nandrolone Decanoate, Nandrolone p-Hexyloxyphenylpropionate, Nandrolone Phenpropionate, Norbolethone, Oxymesterone, Pizotyline, Quinbolone, Stenbolone e Trenbolone;

Analgésicos (dentais) como Chiorobutanol, cravo-da-índia e eugenol;

Analgésicos (narcóticos) tais como Alfentanil, Allylprodine, Alphaprodine, Anileridine, Benzylmorphine, Bezitramide, Buprenorphine, Butorphanol, Clonitazene, Codeine, Codeine Methyl Bromide, Codeine Phosphate, Codeine Sulfate, Desomorphine, Dextromoramide, Dezocine, Diampromide, Dihydrocodeine, Dihydrocodeinone Enol Acetate, Dihydromorphine, Dimenoxadol, Dimepheptanol, Dimethyithiambutene, Dioxaphetyl Butyrate, Dipipanone, Eptazocine, Ethoheptazine, Ethylmethlythiambutene, Ethylmorphine, Etonitazene, Fentanyl, Hydrocodone, Hydrocodone Bitartrate, Hydromorphone, Hydroxypethidine, Isomethadone, Ketobemidone, Levorphanol, Lofentanil, Meperidine, Meptazinol, Metazocine, Methadone Hydrochloride, Metopon, Morphine, Morphine Derivatives, Myrophine, Nalbuphine, Narceine, Nicomorphine, Norlevorphanol, Normethadone, Normorphine, Norpipanone, Opium, Oxycodone, Oxymorphone, Papaveretum, Pentazocine, Phenadoxone, Phenazocine, Pheoperidine, Piminodine, Piritramide, Proheptazine, Promedol, Properidine, Propirarn, Propoxyphene, Sufentanil e Tilidine;

Analgésicos (não-narcóticos) tais como Acetaminophen, Acetaminosalol, Acetanilide, Acetylsalicylsalicylic Acid, Alclofenac, Alminoprofen, Aloxiprin, Aluminum Bis(acetylsalicylate), Aminochlorthenoxazin, 2-Amino-4-picoline, Aminopropylon, Aminopyrine, Ammonium Salicylate, Antipyrine, Antipyrine Salicylate, Antrafenine, Apazone, Aspirin, Benorylate, Benoxaprofen, Benzpiperylon, Benzydamine, p-Bromoacetanilide, 5-Bromosalicylic Acid Acetate, Bucetin, Bufexamac, Bumadizon, Butacetin, Calcium Acetylsalicylate, Carbamazepine, Carbetidine, Carbiphene,

Carsalam, Chloralantipyrine, Chlorthenoxazin(e), Choline
 Salicylate, Cinchophen, Ciramadol, Clometacin, Cropropamide,
 Crotethamide, Dexoxadrol, Difenamizole, Diflunisal,
 Dihydroxyaluminum Acetylsalicylate, Dipyroceryl, Dipyrone,
 5 Emorfazone, Enfenamic Acid, Epirizole, Etersalate,
 Ethenzamide, Ethoxazene, Etodolac, Felbinac, Fenoprofen,
 Floctafenine, Flufenamic Acid, Fluoresone, Flupirtine,
 Fluproquazone, Flurbiprofen, Fosfosal, Gentisic Acid,
 Glafenine, Ibufenac, Imidazole Salicylate, Indomethacin,
 10 Indoprofen, Isofezolac, Isoladol, Isonixin, Ketoprofen,
 Ketorolac, p-Lactophenetide, Lefetamine, Loxoprofen, Lysine
 Acetylsalicylate, Magnesium Acetylsalicylate,
 Methotrimoprazine, Metofoline, Mioprofen, Morazone,
 Morpholine Salicylate, Naproxen, Nefopam, Nifenazone, 5'
 15 Nitro-2' propoxyacetanilide, Parsalimide, Perisoxal,
 Phenacetin, Phenazopyridine Hydrochloride, Phenocoll,
 Phenopyrazone, Phenyl Acetylsalicylate, Phenyl Salicylate,
 Phenylamidol, Pipebuzone, Piperylone, Prodilidine,
 Propacetamol, Propyphenazone, Proxazole, Quinine Salicylate,
 20 Ramifenazone, Rimazolium Metilsulfate, Salacetamide, Salicin,
 Salicylamide, Salicylamide O-Acetic Acid, Salicylsulfuric
 Acid, Salsalte, Salverine, Simetride, Sodium Salicylate,
 Sulfamipyrine, Suprofen, Talniflumate, Tenoxicam,
 Terofenamate, Tetradrine, Tinoridine, Tolfenamic Acid,
 25 Tolpronine, Tramadol, Viminol, Xenbucin e Zomepirac;
 Androgênios tais como Androsterone, Boldenone,
 Dehydroepiandrosterone, Fluoxymesterone, Mestanolone,
 Mesterolone, Methandrostenolone, 17-Methyltestosterone, 17 α -
 Methyltestosterone 3-Cyclopentyl Enol Ether, Norethandrolone,
 30 Norrnethandrone, Oxandrolone, Oxymesterone, Oxymetholone,
 Prasterone, Stanlolone, Stanozolol, Testosterone,
 Testosterone 17-Chloral Hemiacetal, Testosterone
 17 β -Cypionate, Testosterone Enanthate, Testosterone

Nicotinate, Testosterone Pheynylacetate, Testosterone Propionate e Tiomesterone;

Anestésicos tais como Acetamidoeugenol, Alfadolone Acetate, Alfaxalone, Amucaine, Amolanone, Amylocaine
 5 Hydrochloride, Benoxinate, Benzocaine, Betoxycaine, Biphenamine, Bupivacaine, Butacaine, Butaben, Butanilicaine, Burethamine, Buthalital Sodium, Butoxycaine, Carticaine, 2-Chloroprocaine Hydrochloride, Cocaethylene, Cocaine, Cyclomethycaine, Dibucaine Hydrochloride, Dimethisoquin,
 10 Dimethocaine, Dipradon Hydrochloride, Dyclonine, Ecgonidine, Ecgonine, Ethyl Aminobenzoate, Ethyl Chloride, Etidocaine, Etroxadol, β -Eucaine, Euprocine, Fenalcomine, Fomocaine, Hexobarbital, Hexylcaine Hydrochloride, Hydroxydione Sodium, Hydroxyprocaine, Hydroxytetracaine, Isobutyl p-Aminobenzoate,
 15 Kentamine, Leucinocaine Mesylate, Levoxadol, Lidocaine, Mepivacaine, Meprylcaine Hydrochloride, Metabutoxycaine Hydrochloride, Methohexital Sodium, Methyl Chloride, Midazolam, Myrtecaine, Naepaine, Octacaine, Orthocaine, Oxethazaine, Parethoxycaine, Phenacaine Hydrochloride,
 20 Phencyclidine, Phenol, Piperocaine, Piridocaine, Polidocanol, Pramoxine, Prilocaine, Procaine, Propanidid, Propanocaine, Proparacaine, Propipocaine, Propofol, Propoxycaine Hydrochloride, Pseudococaine, Pyrrocaine, Quinine Urea Hydrochloride, Risocaine, Salicyl Alcohol, Tetracaine
 25 Hydrochloride, Thialbarbital, Thimylal, Thiobutabarbital, Thiopental Sodium, Tolycaine, Trimecaine e Zolamine;

Antianoréxicos tais como Aminorex, Amphecloral, Amphetamine, Benzphetamine, Chlorphentermine, Clobenzorex, Cloforex, Clortermine, Cyclexedrine, Destroamphetamine
 30 Sulfate, Diethylpropion, Diphemethoxidine, N-Ethylamphetamine, Fenbutrazate, Fenfluramine, Fenproporex, Furfurylmethylamphetamine, Levophacetopate, Mazindol, Mefenorex, Metamfeoproamone, Methamphetamine,

Norpseudoephedrine, Phendimetrazine, Phendimetrazine Tartrate, Phenmetrazine, Phenpentetermine, Phenylpropanolamine Hydrochloride e Picilorex;

5 Anti-helmínticos (Cestódeos) tais como Arecoline, Aspidin, Aspidinol, Dichlorophen(e), Embelin, Kosin, Napthalene, Niclosamide, Pellertierine, Pellertierine Tannate e Quinacrine;

10 Anti-helmínticos (Nematódeos) tais como Alantolactone, Amoscanate, Ascaridole, Bephenium, Bitoscanate, Carbon Tetrachloride, Carvacrol, Cyclobendazole, Diethylcarbamazine, Diphenane, Dithiazanine Iodide, Dymanthine, Gentian Violet, 4-Hexylresorcinol, Kainic Acid, Mebendazole, 2-Napthol, Oxantel, Papain, Piperazine, Piperazine Adipate, Piperazine Citrate, Piperazine Edetate
15 Calcium, Piperazine Tartrate, Pyrntel, Pyrvinium Pamoate, α -Santonin, Stilbazium Iodide, Tetrachloroethylene, Tetramisole, thiabendazole, Thymol, Thymyl N-Isoamylcarbamate, Triclofenol Piperazine e Urea Stibamine;

20 Anti-helmínticos (Onchocerca) como Ivermectin e Suramin Sodium;

25 Anti-helmínticos (Schistosoma) como Amoscanate, Amphotalide, Antimony Potassium Tartrate, Antimony Sodium Gluconate, Antimony Sodium Tartrate, Antimony Sodium Thioglycollate, Antimony Thioglycollamide, Becanthone, Hycanthone, Lucanthone Hydrochloride, Niridazole, Oxamniquine, Praziquantel, Stibocaptate, Stibophen e Urea Stibamine;

Anti-helmínticos (Trematódeos) tais como Anthiolimine e Tetrachloroethylene;

30 Drogas antiacne tais como Adapelene, Algestone Acetophenide, Azelaic Acid, Benzoyl Peroxide, Cyoctol, Cyproterone, Motretinide, Resorcinol, Retinoic Acid, Tetroquinone e Tretinonine;

Antialérgicos tais como Amlexanox, Astemizole, Azelastine, Cromolyn, Fenpiprane, Histamine, Ibudilast, Nedocromil, Oxatomide, Pentigetide, Poison Ivy Extract, Poison Oak Extract, Poison Sumac Extract, Repirinast,
 5 Tranilast, Traxanox e Urushiol;

Antiaméebicos tais como Arsthinol, Bialamicol, Carbarsone, Cephaeline, Chlorbetamide, Chloroquine, Chlorphenoxamide, Chlortetracycline, Dehydroemetine, Dibromopropamidine, Diloxanide, Dephetarsone, Emetine,
 10 Fumagillin, Glaucarubin, Glycobiarsol, 8-Hydroxy-7-iodo-5-quinolinesulfonic Acid, Iodochlorhydroxyquin, Iodoquinol, Paromomycin, Phanquinone, Phearsone Sulfoxylate, Polybenzarsol, Propamidine, Quinfamide, Secnidazole, Sulfarside, Teclozan, Tetracycline, Thiocarbamizine,
 15 Thiocarbarsone e Tinidazole;

Antiandrogênicos tais como Bifluranol, Cyoctol, Cyproterone, Delmadinone Acetate, Flutimide, Nilutamide e Oxendolone;

Antianginais tais como Acebutolol, Alprenolol, Amiodarone, Amlodipine, Arotinolol, Atenolol, Bepridil,
 20 Bevantolol, Bucumolol, Bufetolol, Bufuralol, Bunitrolol, Bupranolol, Carozolol, Carteolol, Carvedilol, Celiprolol, Cinepazet Maleate, Diltiazem, Epanolol, Felodipine, Gallopamil, Imolamine, Indenolol, Isosorbide Dinitrate, Isradipine, Limaprost, Mepindolol, Metoprolol, Molsidomine,
 25 Nadolol, Nicardipine, Nifedipine, Nifenalol, Nilvadipine, Nipradilol, Nisoldipine, Nitroglycerin, Oxprenolol, Oxyfedrine, Ozagrel, Penbutolol, Pentaerythritol Tetranitrate, Pindolol, Pronethalol, Propranolol, Sotalol,
 30 Terodiline, Timolol, Toliprolol e Verapamil;

Antiarrítmicos tais como Acebutol, Acecaine, Adenosine, Ajmaline, Alprenolol, Amiodarone, Amoproxan, Aprindine, Arotinolol, Atenolol, Bevantolol, Bretylium

Tosylate, Bubumolol, Bufetolol, Bunaftine, Bunitrolol, Bupranolol, Butidrine Hydrochloride, Butobendine, Capobenic Acid, Carazolol, Carteolol, Cifenline, Cloranolol, Disopyramide, Encainide, Esmolol, Flecainide, Gallopamil, 5 Hydroquinidine, Indecainide, Indenolol, Ipratropium Bromide, Lidocaine, Lorajmine, Lorcainide, Meobentine, Metipranolol, Mexiletine, Moricizine, Nadoxolol, Nifenalol, Oxprenolol, Penbutolol, Pindolol, Pirmenol, Practolol, Prajmaline, Procainamide Hydrochloride, Pronethalol, Propafenone, 10 Propranolol, Pyrinoline, Quinidine Sulfate, Quinidine, Sotalol, Talinolol, Tirnolol, Tocainide, Verapamil, Viquidil e Xibenolol;

Antiarterioscleróticos tais como Pyridinol Carbamate;

15 Antiartríticos/Anti-reumáticos tais como Allocupreide Sodium, Auranofin, Aurothioglucoose, Aurothioglycanide, Azathioprine, Calcium 3-Aurothio-2-propanoi-1-suifonate, Celecoxib, Chloroquine, Clobuzarit, Cuproxoline, Diacerein, Glucosamine, Gold Sodium Thiomalate, 20 Gold Sodium Thiosulfate, Hydroxychloroquine, Kebuzone, Lobenzarit, Melittin, Methotrexate, Myoral e Penicillamine;

Drogas (antibióticas) anti-bacterianas incluindo: Aminoglicosídeos tais como Amikacin, Apramycin, Arbekacin, Bambermycins, Butirosin, Dibekacin, Dihdrostreptomycin, 25 Fortimicin(s), Gentamicin, Ispamicin, Kanamycin, Micronomicin, Neomycin, Neomycin Undecylenate, Netilmicin, Paromomycin, Ribostamycin, Sisomicin, Spectinomycin, Streptomycin, Streptonicozid e Tobramycin;

Anfenicóis tais como Azidamfenicol, 30 Chloramphenicol, Chloramphenicol Palmitate, Chloramphenicol Pantothenate, Florfenicol e Thiamphenicol;

Ansamícinas tais como Rifamide, Rifampin, Rifamycin e Rifaximin;

β -lactamas, incluindo: Carbapenemas tais como Imipenem;

Cefalosporinas tais como Cefactor, Cefadroxil, Cefamandole, Cefatrizine, Cefazedone, Cefazolin, Cefixime, 5 Cefmenoxime, Cefodizime, Cefonicid, Cefoperazone, Ceforanide, Cefotaxime, Cefotiam, Cefpimizole, Cefpirimide, Cefpodoxime Proxetil, Cefroxadine, Cefsulodin, Ceftazidime, Cefteram, Ceftezole, Ceftibuten, Ceftizoxime, Ceftriaxone, Cefuroxime, Cefuzonam, Cephacetrile Sodium, 10 Cephalixin, Cephaloglycin, Cephaloridine, Cephalosporin, Cephalothin, Cephapirin Sodium, Cephradine e Pivcefalexin;

Cefamicinas tais como Cefbuperazone, Cefmetazole, Cefminox, Cefetan e Cefoxitin;

Monobactamas tais como Aztreonam, Carumonam e 15 Tigemonam;

Oxacefemas tais como Flomoxef e Moxolactam;

Penicilinas tais como Amidinocillin, Amdinocillin Pivoxil, Amoxicillin, Ampicillan, Apalcillin, Aspoxicillin, Azidocillan, Azlocillan, Bacampicillin, Benzylpenicillinic 20 Acid, Benzylpenicillin Sodium, Carbenicillin, Carfecillin Sodium, Carindacillin, Clometocill in, Cloxacill in, Cyclacillin, Dicloxacillin, Diphenicillin Sodium, Epicillin, Fenbenicillin, Floxicillin, Hetacillin, Lenampicillin, Metampicillin, Methicillin Sodium, Mezlocillin, Nafcillin 25 Sodium, Oxacillin, Penamecillin, Penethamate Hydriodide, Penicillin G Benethamine, Penicillin G Benzathine, Penicillin G Benzhydrylamine, Penicillin G Calcium, Penicillin G Hydrabamine, Penicillin G Potassium, Penicillin G Procaine, Penicillen N, Penicillin O, Penicillin V, Penicillin V 30 Benzathine, Penicillin V Hydrabamine, Penimepicycline, Phenethicillin Potassium, Piperacillin, Pivapicillin, Propicillin, Quinacillin, Sulbenicillin, Talampicillin, Temocillin e Ticarcillin;

Lincosamidas tais como Clindamycin e Lincomycin;

Macrolídeos tais como Azithroimycin, Carbomycin, Clarithromycin, Erythromycin, Erythromycin Acistrate, Erythromycin Estolate, Erythromycin Glucoheptonate, 5 Erythromycin Lactobionate, Erythromycin Propionate, Erythromycin Stearate, Josamycin, Leucomycins, Midecamycins, Miokamycin, Oleandomycin, Primycin, Rokitamycin, Rosaramicin, Roxithromycin, Spiramycin e Troleandornycin;

10 Polipeptídeos tais como Amphomycin, Bacitracin, Capreomycin, Colistin, Enduracidin, Enviomycin, Fusafungine, Gramicidin(s), Gramicidin S, Mikamycin, Polymyxin, Polymyxin B-Methanesulfonic Acid, Pristinamycin, Ristocetin, Teicoplanin, Thiostrepton, Tuberactinomycin, Tyrocidine, Tyrothricin, Vancomycin, Viomycin, Viomycin Pantothenate, 15 Virginiamycin e Zinc Bacitracin;

Tetraciclinas tais como Apicycline, Chlortetracycline, Clomocycline, Demeclocycline, Doxycycline, Guamecycline, Lymecycline, Meclocycline, Methacycline, Minocycline, Oxytetracycline, Penimepicycline, Pipacycline, 20 Rolitetracycline, Sancycline, Senociclin e Tetracycline; e outros antibióticos tais como Cycloserine, Mupirocin e Tuberin;

Drogas anti-bacterianas (sintéticas), incluindo: 2,4-Diaminopirimidinas tais como Brodimoprim, Tetroxoprim e 25 Trimethoprim;

Nitrofuranos tais como Furaltadone, Furazolium Chloride, Nifuradene, Nifuratel, Nifurfoline, Nifurpirinol, Nifurprazine, Nifurtoinol e Nitrofurantoin;

30 Quinolonas e Análogos tais como Amifloxacin, Cinoxacin, Ciprofloxacin, Difloxacin, Enoxacin, Fleroxacin, Flumequine, Lomefloxacin, Miloxacin, Nalidixic Acid, Norfloxacin, Ofloxacin, Oxolinic Acid, Pefloxacin, Pipemidic Acid, Piromidic Acid, Rosoxacin, Temafloxacin e Tosufloxacin;

Sulfonamidas tais como Acetyl Sulfamethoxypyrazine,
 Acetyl Sulfisoxazole, Azosulfamide, Benzylsulfamide,
 Chloramine-B, Chloramine-T, Dichloramine T,
 Formosulfathiazole, N₂ Formylsulfisomidine, N² -β-D-
 5 Glucosylsulfanilamide, Mafenide, 4'-
 (Methylsulfamoyl)sulfanilanilide, p-Nitrosulfathiazole,
 Noprylsulfamide, Phthalylsulfacetamide,
 Phthalylsulfathiazole, Salazosulfadimidine,
 Succinylsulfathiazole, Sulfabenzamide, Sulfacetamide,
 10 Sulfachlorpyridazine, Sulfachrysoidine, Sulfacytine,
 Sulfadiazine, Sulfadicramide, Sulfadimethoxine, Sulfadoxine,
 Sulfaethidole, Sulfaguanidine, Sulfaguanol, Sulfalene,
 Sulfaloxic Acid, Sulfamerazine, Sulfameter, Sulfamethazine,
 Sulfamethizole, Sulfamethomidine, Sulfamethoxazole,
 15 Sulfamethoxypyridazine, Sulfametrole, Sulfamidochrysoidine,
 Sulfamoxole, Sulfanilamide, Sulfanilamidomethanesulfonic Acid
 Triethanolamine Salt, 4-Sulfanilamidosalicylic Acid, N-
 Sulfanilylsulfanilamide, Sulfanilylurea, N-Sulfanilyl-3,4-
 xylamide, Sulfanitran, Sulfaperine, Sulfaphenazole,
 20 Sulfaproxyline, Sulfapyrazine, Sulfapyridine, Sulfasomizole,
 Sulfasymazine, Sulfathiazole, Sulfathiourea, Sulfatolamide,
 Sulfisomidine e Sulfisoxazole;

Sulfonas tais como Acedapsone, Acediasulfone,
 Acetosulfone Sodium, Dapsone, Diathymosulfone, Glucosulfone
 25 Sodium, Solasulfone, Succisulfone, Sulfanilic Acid, p-
 Sulfanilylbenzylamine, p,p'-Sulfonyldianiline-
 N,N'digalactoside, Sulfoxone Sodium e Thiazolsulfone; e

outros, tais como Clofoctol, Hexedine, Methenamine,
 Methenamine Anhydromethylene-citrate, Methenamine Hippurate,
 30 Methenamine Mandelate, Methenamine Sulfosalicylate,
 Nitroxoline e Xibornol;

Anticolinérgicos tais como Adiphenine
 Hydrochloride, Alverine, Ambutonium Bromide,

Aminopentamide, Amixetrine, Amprotropine Phosphate,
 Anisotropine Methylbromide, Apoatropine, Atropine, Atropine
 N-Oxide, Benactyzine, Benapryzine, Benzetimide, Benzilonium
 Bromide, Benztropine Mesylate, Bevonium Methyl Sulfate,
 5 Biperiden, Butropium Bromide, N-Butylscopolammonium Bromide,
 Buzepide, Camylofine, Caramiphen Hydrochloride,
 Chlorbenzoxamine, Chiorphenoxamine, Cimetropium Bromide,
 Clidinium Bromide, Cyclo-drine, Cyclonium Iodide, Cycrimine
 Hydrochloride, Deptropine, Dexetimide, Dibutoline Sulfate,
 10 Dicyclomine Hydrochloride, Diethazine, Difemerine,
 Dihexyverine, Diphemaniol Methylsulfate, N-(1,2-Diphenylethyl)
 nicotinamide, Dipipraverine, Diponium Bromide, Emepronium
 Bromide, Endobenzylamine Bromide, Ethopropazine,
 Ethylbenztropine, Ethylbenzhydramine, Etomidoline,
 15 Eucatropine, Fenpiverinium Bromide, Fentonium Bromide,
 Flutropium Bromide, Glycopyrrolate, Heteronium Bromide,
 Hexocyclium Methyl Sulfate, Homatropine, Hyoscyamine,
 Ipratropium Bromide, Isopropamide, Levomepate, Meclozamine,
 Mepenzolate Bromide, Metcaraphen, Methantheline Bromide,
 20 Methixene, Methscopolamine Bromide, Octamylamine, Oxybutynin
 Chloride, Oxyphenacyclimine, Oxyphenonium Bromide,
 Pentapiperide, Penthienate Bromide, Phencarbamide,
 Phenglutarimide, Pipenzolate Bromide, Piperidolate,
 Piperilate, Poldine Methylsulfate, Pridinol, Prifinium
 25 Bromide, Procyclidine, Propantheline Bromide, Propenzolate,
 Propyromazine, Scopolamine, Scopolamine N-Oxide, Stilonium
 Iodide, Stramonium, Sultroponium, Thihexinol, Thiphenamil,
 Tiemonium Iodide, Timepidium Bromide, Tiquizium Bromide,
 Tridihexethyl Iodide, Trihexyphenidyl Hydrochloride,
 30 Tropacine, Tropenzile, Tropicamide, Trospium Chloride,
 Valethamate Bromide e Xenytropium Bromide;

Anticonvulsivantes tais como Acetylpheneturide,
 Albutoin, Aloxicone, Aminogluthetimide, 4-Amino-3-

hydroxybutyric Acid, Atrolactamide, Beclamide, Buramate, Calcium Bromide, Carbamazepine, Cinromide, Clomethiazole, Clonazepam, Decimemide, Diethadione, Dimethadione, Doxenitoin, Eterobarb, Ethadione, Ethosuximide, Ethotoin, 5 Fluoresone, Garbapentin, 5-Hydroxytryptophan, Lamotrigine, Lomactil, Magnesium Bromide, Magnesium Sulfate, Mephenytoin, Mephobarbital, Metharbital, Methetoin, Methsuximide, 5-Methyl-5-(3-phenanthryl)hydantoin, 3-Methyl-5-phenylhydantoin, Narcobarbital, Nimetazepam, Nitrazepam, 10 Paramethadione, Phenacemide, Phenetharbital, Pheneturide, Phenobarbital, Phenobarbital Sodium, Phensuximide, Phenylmethylbarbituric Acid, Phenytoin, Phethenylate Sodium, Potassium Bromide, Pregabatin, Primidone, Progabide, Sodium Bromide, Sodium Valproate, Solanum, Strontium Bromide, 15 Suclofenide, Sulthiame, Tetrantoin, Tiagabine, Trimethadione, Valproic Acid, Valpromide, Vigabatrin e Zonisamide;

Antidepressivos, incluindo: Bicíclicos tais como Binedaline, Caroxazone, Citalopram, Dimethazan, Indalpine, Fencamine, Fluvoxamine Maleate, Indeloxazine Hydrochloride, 20 Nefopam, Nomifensine, Oxitriptan, Oxypertine, Paroxetine, Sertraline, Thiazesim, Trazodone, Venlafaxine e Zometapine;

Hidrazidas/Hidrazinas tais como Benmoxine, Iproclozide, Iproniazid, Isocarboxazid, Nialamide, Octamoxin e Phenelzine;

25 Pirrolidonas tais como Cotinine, Rolicyprine e Rolipram;

Tetracíclicos tais como Maprotiline, Metralindole, Mianserin e Oxaprotiline;

Tricíclicos tais como Adinazolam, Amitriptyline, 30 Amitriptylinoxide, Amoxapine, Butriptyline, Clomipramine, Demexiptiline, Desipramine, Dibenzepin, Dimetracrine, Dothiepin, Doxepin, Fluacizine, Imipramine, Imipramine N-Oxide, Iprindole, Lofepramine, Melitracen, Metapramine,

Nortriptyline, Noxiptilin, Opipramol, Pizotyline,
 Propizepine, Protriptyline, Quinupramine, Tianeptine e
 Trimipramine; e

5 outros, tais como Adrafinil, Benactyzine,
 Bupropion, Butacetin, Deanol, Deanol Aceglumate, Deanol
 Acetamidobenzoate, Dioxadrol, Etoperidone, Febarbamate,
 Femoxetine, Fenpentadiol, Fluoxetine, Fluvoxamine,
 Hematoporphyrin, Hypercinin, Levophacetoperane, Medifoxamine,
 Minaprine, Moclobemide, Oxflozane, Piberaline, Prolintane,
 10 Pyrisuccideanol, Rubidium Chloride, Sulpiride, Sultopride;
 Teniloxazine, Thozalinone, Tofenacin, Toloxatone,
 Tranylcypromine, L-Tryptophan, Viloxazine e Zimeldine;

Antidiabéticos, incluindo: Biguanidas tais como
 Buformin, Metformin e Phenformin;

15 Hormônios tais como Glucagon, Insulin, Insulin
 Injection, Insulin Zinc Suspension, Isophane Insulin
 Suspension, Protamine Zinc Insulin Suspension e Zinc Insulin
 Crystals;

Derivados de Sulfoniluréia tais como Acetohexamide,
 20 1-Butyl-3-metanilylurea, Carbutamide, Chlorpropamide,
 Glibornuride, Gliclazide, Glipizide, Gliquidone, Glisoxepid,
 Glyburide, Glybuthiazol(e), Glybuzole, Glyhexamide,
 Glymidine, Glypinamide, Phenbutamide, Tolazamide, Tolbutamide
 e Tolcyclamide; e

25 outros, tais como Acarbose, Calcium Mesoxalate e
 Miglitol;

Drogas antidiarréicas tais como Acetyltannic Acid,
 Albumin Tannate, Alkofanone, Aluminum Salicylates-Basic,
 Catechin, Difenoxin, Diphenoxylate, Lidamidine, Loperamide,
 30 Mebiquine, Trillium e Uzarin;

Antidiuréticos tais como Desmopressin, Felypressin,
 Lypressin, Ornipressin, Oxycinchophen, Pituitary-Posterior,
 Terlipressin e Vasopressin;

Antiestrogênios tais como Delmadinone Acetate, Ethamoxytriphetol, Tamoxifen e Toremifene;

Drogas antifúngicas (antibióticos), incluindo: Polienos tais como Amphotericin-B, Candicidin, Dermostatin, Filipin, Fungichromin, Hachimycin, Hamycin, Lucensomycin, Mepartricin, Natamycin, Nystatin, Pecilocin e Perimycin; e outros, tais como Azaserine, Griseofulvin, Oligomycins, Neomycin Undecylenate, Pyrrolnitrin, Siccanin, Tubercidin e Viridin;

Drogas antifúngicas (sintéticas), incluindo: Alilaminas tais como Naftifine e Terbinafine;

Imidazóis tais como Bifonazole, Butoconazole, Chlordantoin, Chlormidazole, Cloconazole, Clotrimazole, Econazole, Enilconazole, Fenticonazole, Iaconazole, Ketoconazole, Miconazole, Omoconazole, Oxiconazole, Nitrate, Sulconazole e Tioconazole;

Triazóis tais como Fluconazole, Itraconazole e Terconazole; e

outros, tais como Acrisorcin, Amorolfine, Biphenamine, Bromosalicylchloranilide, Buclosamide, Calcium Propionate, Chlophenesin, Ciclopirox, Cloxyquin, Coparaffinate, Diamthazole, Dihydrochloride, Exalamide, Flucytosine, Halethazole, Hexetidine, Loflucarban, Nifuratel, Potassium Iodide, Propionic Acid, Pyrithione, Salicylanilide, Sodium Propionate, Sulbentine, Tenonitrozole, Tolciclate, Tolindate, Tolnaftate, Tricetin, Ujothion, Undecylenic Acid e Zinc Propionate;

Drogas antiglaucoma tais como Acetazolamide, Befunolol, Betaxolol, Bupranolol, Carteolol, Dapiprazole, Dichlorphenamide, Dipivefrin, Epinephrine, Levobunolol, Methazolamide, Metipranolol, Pilocarpine, Pindolol e Timolol;

Antigonadotropinas tais como Danazol, Gestrinone e Paroxypropione;

Drogas antigota tais como Allopurinol, Carprofen, Colchicine, Probenecid e Sulfinpyrazone;

Anti-histamínicos, incluindo: Derivados de alquilamina tais como Acrivastine, Bamipine, Brompheniramine, 5 Chlorpheniramine, Dimethindene, Metron S, Pheniramine, Pyrrobutamine, Thenaldine, Tolpropamine e Triprolidine;

Éteres de aminoalquila tais como Bietanautine, Bromodiphenhydramine, Carbinoxamine, Clemastine, Diphenlypyraline, Doxylamine, Embramine, Medrylamine, 10 Mephenphydramine, p-Methyldiphenhydramine, Orphenadrine, Phenyltoloxamine, Piprinhydrinate e Setasine;

Derivados de etilenodiamina tais como Alloclamide, p-Bromtripelennamine, Chloropyramine, Chlorothen, Histapyrrodine, Methafurylene, Methaphenilene, Methapyrilene, 5 Phenbenzamine, Pyrilamine, Talastine, Thenyldiamine, Thonzylamine Hydrochloride, Tripelennamine e Zolamine;

Piperazinas tais como Cetirizine, Chiorcyclizine, Cinnarizine, Clocinizine e Hydroxyzine;

Tricíclicos, incluindo: Fenotiazinas tais como 20 Ahistan, Etymemazine, Fenethazine, N-Hydroxyethylpromethazine Chloride, Isopromethazine, Mequitazine, Promethazine, Pyrathiazine e Thiazinamium Methyl Sulfate;

Outros, tais como Azatadine, Clobenzepam, Cyproheptadine, Deptropine, Isothipendyl, Loratadine e 25 Prothipendyl; e

Outros anti-histamínicos tais como Antazoline, Astemizole, Azelastine, Cetoxime, Clemizole, Clobenztropine, Diphenazoline, Diphenhydramine, Fluticasone Propionate, Mebhydroline, Phenindamine, Terfenadine e Tritoqualine;

30 Anti-hiperlipoproteinêmicos, incluindo: Derivados de ácido ariloxialcanóico tais como Beclorbrate, Bazafibrate, Binifibrate, Ciprofibrate, Clinofibrate, Clofibrate, Clofibric Acid, Etonfibrate, Fenofibrate, Gemfibrozil,

Nicofibrate, Pirifibrate, Ronifibrate, Simfibrate e Theofibrate;

Seqüestranes do ácido da bile tais como Cholestyramine Resin, Colestipol e Polidexide;

5 Inibidores da reductase da CoA de HMG tais como Fluvastatin, Lovastatin, Pravastatin Sodium e Simvastatin;

Derivados de ácido nicotínico tais como Aluminum Nicotinate, Acipimox, Niceritrol, Nicoclonate, Nicomol e Oxiniacic Acid;

10 Hormônios da tiróide e análogos tais como Etiroxate, Thyropropic Acid e Thyroxine; e

outros, tais como Acifran, Azacosterol, Benfluorex, β -Benzalbutyramide, Carnitine, Chondroitin Sulfate, Clomestone, Detaxtran, Dextran Sulfate Sodium, 5,8,11,14,17-
15 Eicosapentaenoic Acid, Eritadenine, Furazbol, Meglutol, Melinamide, Mytatrienediol, Ornithine, γ -Oryzanol, Pantethine, Penataerythritol Tetraacetate, α -Phenylbutyramide, Pirozadil, Probucol, α -Sitosterol, Sultosilic Acid, Piperazine Salt, Tiadenol, Triparanol e
20 Xenbucin;

Drogas anti-hipertensivas, incluindo: derivados de ariletanolamina tais como Amosulalol, Bufuralol, Dilevalol, Labetalol, Pronethalol, Sotalol e Sulfinalol;

Derivados de ariloxipropanolamina tais como
25 Acebutolol, Alprenolol, Arotinolol, Atenolol, Betaxolol, Bevantolol, Bisoprolol, Bopindolol, Bunitrolol, Bupranolol, Butofilolol, Carazolol, Carteazolol, Carvedilol, Celiprolol, Cetamolol, Epanolol, Indenolol, Mepindolol, Metipranolol, Metoprolol, Moprolol, Nadolol, Nipradilol, Oxprenolol,
30 Penbutolol, Pindolol, Propranolol, Talinolol, Tetraolol, Timolol e Toliprolol;

Derivados de benzotiadiazina tais como Althiazide, Bendroflumethiazide, Benzthiazide, Benzylhydrochlorothiazide,

Buthiazide, Chlorothiazide, Chlorthalidone, Cyclopenthiazide, Cyclothiazide, Diazoxide, Epithiazide, Ethiazide, Fenquizone, Hydrochlorothiazide, Hydroflumethiazide, Methyclothiazide, Meticrane, Metolazone, Paraflutizide, Polythiazide,
 5 Tetrachlormethiazide e Trichlormethiazide;

Derivados de N-carboxialquila (peptídeo/lactama) tais como Alacepril, Captopril, Cilazapril, Delapril, Enalapril, Enalaprilat, Fosinopril, Lisinopril, Moveltipril, Perindopril, Quinapril e Ramipril;

10 Derivados de diidropiridina tais como Amlodipine, Felodipine, Isradipine, Nicardipine, Nifedipine, Nilvadipine, Nisoldipine e Nitrendipirne;

Derivados de guanidina tais como Amlodipine, Felodipine, Isradipine, Nicardipine, Nifedipine, Nilvadipine,
 15 Nisoldipine e Nitrendipirne;

Derivados de guanidina tais como Bethanidine, Debrisoquin, Guanabenz, Guanaciline, Guanadrel, Guanazodine, Guanethidine, Guanfacine, Guanochlor, Guanoxabenz e Guanoxan;

Hidrazinas e ftalazinas tais como Budralazine, Cadralazine, Dihydralazine, Endralazine, Hydracarbazine,
 20 Hydralazine, Pheniprazine, Pildralazine e Todralazine;

Derivados de imidazol tais como Clonidine, Lofexidine, Phentolamine, Phentolamine Mesylate, Tiamenidine e Tolonidine;

25 Compostos de amônio quaternário tais como Azamethonium Bromide, Chlorisondamine Chloride, Hexamethonium, Pentacynium Bis(methyl sulfate), Pentamethonium Bromide, Pentolinium Tartate, Phenactopinium Chloride e Trimethidiunum Methosulfate;

30 Derivados de quinazolina tais como Alfuzosin, Bunazosin, Doxazosin, Prasosin, Terazosin e Trimazosin;

Derivados de reserpina tais como Bietaserpine, Deserpidine, Rescinnamine, Reserpine e Syrosingopine;

Derivados de sulfonamida tais como Ambuside, Clopamide, Furosemide, Indapamide, Quinethazone, Tripamide e Xipamide; e

5 outros, tais como Ajmaline, γ -Aminobutyric Acid, Bufeniode, Candesartan, Chlorthalidone, Cicletaine, Ciclosidomine, Cryptenamine Tannates, Eprosartan, Fenoldopam, Flosequinan, Indoramin, Irbesartan, Ketanserin, Losartan, Metbutamate, Mecamylamine, Methyldopa, Methyl 4-Pyridyl Ketone Thiosemicarbarzone, Metolazone, Minoxidil, Muzolimine, 10 Pargyline, Pempidine, Pinacidil, Piperoxan, Primaperone, Protoveratrines, Raubasine, Rescimetol, Rilmenidene, Saralasin, Sodium Nitroprusside, Ticrynafen, Trimethaphan Camsylate, Tyrosinase, Urapidil e Valsartan;

Anti-hipertiróidicos tais como 2-Amino-4- 15 methylthiazole, 2-Aminothiazole, Carbimazole, 3,5-Dibromo-L-tyrosine, 3,5-Diiodotyrosine, Hinderin, Iodine, Iothiouracil, Methimazole, Methylthiouracil, Propylthiouracil, Sodium Perchlorate, Thibenzazoline, Thiobarbital e 2-Thiouracil;

Drogas anti-hipotensivas tais como Amezinium Methyl 20 Sulfate, Angiotensin Amide, Dimetofrine, Dopamine, Etifelmin, Etilefrin, Gepefrine, Metaraminol, Midodrine, Norepinephrine, Pholedrinead e Synephrine;

Drogas anti-hipotiróidicas tais como Levothyroxine Sodium, Liothyronine, Thyroid, Thyroidin, Thyroxine, 25 Tiratricol e TSH;

Drogas antiinflamatórias (não-esteroidais), incluindo: Derivados de ácido aminoarilcarboxílico tais como Enfenamic Acid, Etofenamate, Flufenamic Acid, Isonixin, Meclofenamic Acid, Mefanamic Acid, Niflumic Acid, 30 Talniflumate, Terofenamate e Tolfenamic Acid;

Derivados de ácido arilacético tais como Acemetacin, Alclofenac, Amfenac, Bufexamac, Cinmetacin, Clopirac, Diclofenac Sodium, Etodolac, Felbinac, Fenclofenac,

Fenclozac, Fenclozic Acid, Fentiazac, Glucametacin, Ibufenac, Indomethacin, Isofezolac, Isoxepac, Lonazolac, Metiazinic Acid, Oxametacine, Proglumetacin, Sulindac, Tiaramide, Tolmetin e Zomepirac;

5 Derivados de ácido arilbutírico tais como Bumadizon, Butibufen, Fenbufen e Xenbucin;

Ácidos arilcarboxílicos tais como Clidanac, Ketorolac e Tinoridine;

10 Derivados de ácido arilpropiónico tais como Alminoprofen, Benoxaprofen, Bucloxic Acid, Carprofen, Fenoprofen, Flunoxaprofen, Flurbiprofen, Ibuprofen, Ibuproxam, Indoprofen, Ketoprofen, Loxoprofen, Miroprofen, Naproxen, Oxaprozin, Piketoprofen, Pirprofen, Pranoprofen, Protizinic Acid, Suprofen e Tiaprofenic Acid;

15 Pirazóis tais como Difenamizole e Epirizole;

Pirazolonas tais como Apazone, Benzpiperylon, Feprazone, Mofebutazone, Morazone, Oxyphenbutazone, Phenybutazone, Pipebuzone, Propyphenazone, Ramifenazone, Suxibuzone e Thiazolinobutazone;

20 Derivados de ácido salicílico tais como Acetaminosalol, Aspirin, Benorylate, Bromosaligenin, Calcium Acetylsalicylate, Diflunisal, Etersalate, Fendosal, Gentisic Acid, Glycol Salicylate, Imidazole Salicylate, Lysine Acetylsalicylate, Mesalamine, Morpholine Salicylate, 1-Narhthyl Salicylate, Olsalazine, Parsalmide, Phenyl Acetylsalicylate, Phenyl Salicylate, Salacetamide, Salicylamine O-Acetic Acid, Salicylsulfuric Acid, Salsalate e Sulfasalazine;

30 Tiazinacarboxamidas tais como Droxicam, Isoxicam, Piroxicam e Tenoxicam; e

outros, tais como ϵ -Acetamidocaproic Acid, S-Adenosylmethionine, 3-Amino-4-hydroxybutyric Acid, Amixetrine, Bendazac, Benzydamine, Bucolome, Difenpiramide,

Ditazol, Emorfazone, Guaiazulene, Nabumetone, Nimesulide, Orgotein, Oxaceprol, Paranyline, Perisoxal, Pifoxime, Proquazone, Proxazole e Tenidap;

Drogas antimalária tais como Acedapsone,
 5 Amodiaquin, Arteether, Artemether, Artemisinin, Artesunate, Bebeerine, Berberine, Chirata, Chlorguanide, Chloroquine, Chlorproguanil, Cinchona, Cinchonidine, Cinchonine, Cycloguanil, Gentiopicrocin, Halofantrine, Hydroxychloroquine, Mefloquine Hydrochloride, 3-Methylarsacetin, Pamaquine,
 10 Plasmocid, Primaquine, Pyrimethamine, Quinacrine, Quinine, Quinine Bisulfate, Quinine Carbonate, Quinine Dihydrobromide, Quinine Dihydrochloride, Quinine Ethylcarbonate, Quinine Formate, Quinine Gluconate, Quinine Hydriodide, Quinine Hydrochloride, Quinine Salicylate, Quinine Sulfate, Quinine
 15 Tannate, Quinine Urea Hydrochloride, Quinocide, Quinoline e Sodium Arsenate Diabasic;

Drogas antienxaqueca tais como Alpiropride, Dihydroergotamine, Eletriptan, Ergocornine, Ergocorninine, Ergocryptine, Ergot, Ergotamine, Flumedroxone acetate,
 20 Fonazine, Lisuride, Methysergid(e), Naratriptan, Oxetorone, Pizotyline, Rizatriptan e Sumatriptan;

Drogas antináusea tais como Acetylleucine Monoethanolamine, Alizapride, Benzquinamide, Bietanautine, Bromopride, Buclizine, Chlorpromazine, Clebopride, Cyclizine,
 25 Dimenhydrinate, Diphenidol, Domperidone, Granisetron, Meclizine, Methalltal, Metoclopramide, Metopimazine, Nabilone, Ondansteron, Oxypendyl, Pipamazine, Piprinhydrinate, Prochlorperazine, Scopolamine, Tetrahydrocannabinols, Thiethylperazine, Thioproperzaine e
 30 Trimethobenzamide;

Drogas antineoplásticas, incluindo: Agentes alquilantes, tais como Sulfonatos de alquila tais como Busulfan, Improsulfan e Pipsulfan;

Aziridinas tais como Benzodepa, Carboquone, Meturedpa e Uredpa;

Etileniminas e metilmelaminas tais como Altretamine, Triethylenemelamine, Triethylenephosphoramide, 5 Triethylenethiophosphoramide e Trimethylolomelamine;

Mostardas de nitrogênio tais como Chlorambucil, Chlornaphazine, Chclophosphamide, Estramustine, Ifosfamide, Mechlorethamine, Mechlorethamine Oxide Hydrochloride, Melphalan, Novembichin, Phenesterine, Prednimustine, 10 Trofosfamide e Uracil Mustard;

Nitrosouréias tais como Carmustine, Chlorozotocin, Fotemustine, Lomustine, Nimustine e Ranimustine; e

Outros, tais como Camptothecin, Dacarbazine, Mannomustine, Mitobronitol, Mitolactol e Pipobroman;

15 Antibióticos tais como Aclacinomycins, Actinomycin F₁, Anthramycin, Azaserine, Bleomycins, Cactinomycin, Carubicin, Carzinophilin, Chromomycins, Dactinomycin, Daunorubicin, 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine, Doxorubicin, Epirubicin, Mitomycins, Mycophenolic Acid, Nogalamycin, 20 Olivomycins, Peplomycin, Plicamycin, Porfiromycin, Puromycin, Streptonigrin, Streptozocin, Tubercidin, Ubenimex, Zinostatin e Zorubicin;

Antimetabólitos, incluindo: Análogos de ácido fólico tais como Denopterin, Methotrexate, Pteropterin e 25 Trimetrexate;

Análogos de purina tais como Fludarabine, 6-Mercaptopurine, Thiamiprine e Thioguanaine; e

Análogos de pirimidina tais como Ancitabine, Azacitidine, 6-Azauridine, Carmofur, Cytarabine, 30 Doxifluridine, Enocitabine, Floxuridine Fluroouracil e Tegafur;

Enzimas tais como L-Asparaginase; e

Outros, tais como Aceglatone, Amsacrine,

Bestrabucil, Bisantrone, Bryostatin 1, Carboplatin, Cisplatin, Defofamide, Demecolcine, Diaziquone, Elfornithine, Elliptinium Acetate, Etoglucid, Etoposide, Gallium Nitrate, Hydroxyurea, Interferon- α , Interferon- β , Interferon- γ ,
 5 Interleukine-2, Lentinan, Letrozole, Lonidamine, Mitoguazone, Mitoxantrone, Mopidamol, Nitracrine, Pentostatin, Phenamet, Pirarubicin, Podophyllinicc Acid, 2-Ethythydrazide, Polynitrocubanes, Procarbazine, PSK7, Razoxane, Sizofiran, Spirogermanium, Taxol, Teniposide, Tenuazonic Acid,
 10 Triaziquone, 2.2'.2"-Trichlorotriethylamine, Urethan, Vinblastine, Vincristine, Vindesine e Vinorelbine;

Drogas antineoplásticas (hormonais), incluindo: Androgênios tais como Calusterone, Dromostanolone Propionate, Epitiostanol, Mepitiostane e Testolactone;

15 Antiadrenais tais como Aminoglutethimide, Mitotane e Trilostane;

Antiangrogênios tais como Flutamide e Nilutamide; e Antiestrogênios tais como Tamoxifen e Toremifene;

Adjuntos antineoplásticos incluindo reabastecedores
 20 de ácido fólico tais como Frolinic Acid;

Drogas antiparkinsonianas tais como Amantadine, Benserazide, Bietanautine, Biperiden, Bromocriptine, Budipine, Cabergoline, Carbidopa, Deprenyl (a/k/a L-deprenyl, L-deprenil, L-deprenaline e selegiline), Dexetimide,
 25 Diethazine, Diphenhydramine, Droxidopa, Ethopropazine, Ethylbenzhydramine, Levodopa, Naxagolide, Pergolide, Piroheptine, Pramipexole, Pridinol, Prodipine, Quinpirole, Remacemide, Ropinirole, Terguride, Tigloidine e Trihexyphenidyl Hydrochloride;

30 Drogas antifeocromocitoma tais como Metyrosine, Phenoxybenzamine e Phentolamine;

Drogas antipneumocísticas tais como Effornithine, Pentamidine e Sulfamethoxazole;

Drogas anti-hipertrofia prostática tais como Gestonorone Caproate, Mepartricin, Oxendolone e Proscar⁷;

Drogas antiprotozoários (Leshmania) tais como Antimony Sodium Gluconate, Ethylstibamine, 5 Hydroxystilbamidine, N-Methylglucamine, Pentamidine, Stilbamidine e Urea Stibamine;

Drogas antiprotozoários (Trichomonas) como Acetarstone, Aminitrozole, Anisomycin, Azanidazole, Forminitrazole, Furazolidone, Hachimycin, Lauroguadine, 10 Mepartricin, Metronidazole, Nifuratel, Nifuroxime, Nimorazole, Secnidazole, Silver Picrate, Tenonitrozole e Tinidazole;

Drogas antiprotozoários (Trypanosoma) tais como Benznidazole, Eflornithine, Melarsoprol, Nifurtimox, 15 Oxophenarsine, Hydrochloride, Pentamidine, Propamidine, Puromycin, Quinapyramine, Stilbamidine, Suramin Sodium, Trypan Red e Tryparasmeide;

Antipuríticos tais como Camphor, Cyproheptadine, Dichlorisone, Glycine, Halometasone, 3-Hydroxycamphor, 20 Menthol, Mesulphen, Methdilazine, Phenol, Polidocanol, Risocaine, Spirit of Camphor, Thenaldine, Tolpropamine e Trimeprazine;

Drogas antipsoriáticas tais como Acitretin, Ammonium Salicylate, Anthralin, 6-Azaauridine, Bergapten(e), 25 Chrysarobin, Etretinate e Pyrogallol;

Drogas antipsicóticas, incluindo: Butirofenonas tais como Benperidol, Bromperidol, Droperidol, Fluanisone, Haloperidol, Melperone, Moperone, Pipamperone, Sniperone, Timiperone e Trifluoperidol;

30 Fenotiazinas tais como Acetophenazine, Butaperazine, Carphenazine, Chlorproethazine, Chlorpromazine, Clospirazine, Cyamemazine, Dixyrazine, Fluphenazine, Imiclopazine, Mepazine, Mesoridazine, Methoxypromazine,

Metofenazate, Oxaflumazine, Perazine, Pericyazine, Perimethazine, Perphenazine, Piperacetazine, Pipotiazine, Prochlorperazine, Promazine, Sulfuridazine, Thiopropazate, Thioridazine, Trifluoperazine e Triflupromazine;

5 Tioxantenos tais como Chlorprothixene, Clopenthixol, Flupentixol e Thiothixene;

Outros tricíclicos tais como Benzquinamide, Carpipramine, Clocapramine, Clomacran, Clothiapine, Clozapine, Opipramol, Prothipendyl, Tetrabenazine, e
10 Zotepine; e

Outros, tais como Alizapride, Amisulpride, Buramate, Fluspirilene, Molindone, Penfluridol, Pimozide, Spirilene e Sulpiride;

Antipiréticos tais como Acetaminophen,
15 Acetaminosalol, Acetanilide, Aconine, Aconite, Aconitine, Alclofenac, Aluminum Bis(acetylsalicylate), Aminochlorthenoxazin, Aminopyrine, Aspirin, Benorylate, Benzydamine, Berberine, p-Bromoacetanilide, Bufexamac, Bumadizon, Calcium Acetylsalicylate, Chlorthenoxazin(e),
20 Choline Salicylate, Clidanac, Dihydroxyaluminum Acetylsalicylate, Dipyroceryl, Dipyrone, Epirizole, Etersalate, Imidazole Salicylate, Indomethacin, Isofezolac, p-Lactophenetide, Lysine Acetylsalicylate, Magnesium Acetylsalicylate, Meclofenamic Acid, Morazone, Morpholine
25 Salicylate, Naproxen, Nifenazone, 51-Nitro-2'-propoxyacetanilide, Phenacetin, Phenicarbazide, Phenocoll, Phenopyrazone, Phenyl Acetylsalicylate, Phenyl Salicylate, Pipebuzone, Propacetamol, Propyphenazone, Ramifenazone, Salacetamide, Salicylamide O-Acetic Acid, Sodium Salicylate,
30 Sulfamipyrine, Tetrandrine e Tinoridine;

Drogas antirickettsianas tais como p-Aminobenzoic Acid, Chloramphenicol, Chloramphenicol Palmitate, Chloramphenicol Pantothenate e Tetracycline;

Drogas anti-seborréicas tais como Chloroxine, 3-O-Lauroylpyridoxol Diacetate, Piroctone, Pyrithione, Resorcinol, Selenium Sulfides e Tioxolone;

Antissépticos, incluindo: Guanidinas tais como
5 Alexidine, Ambazone, Chlorhexidine e Picloxydine;

Halogênios e compostos de halogênio tais como
Bismuth Iodide Oxide, Bismuth Iodosubgallate, Bismuth
Tribromophenate, Bornyl Chloride, Calcium Iodate, Chlorinated
Lime, Cloflucarban, Flurosolan, Iodic Acid, Iodine, Iodine
10 Monochloride, Iodine Trichloride, Iodoform, Methenamine
Tetraiodine, Oxychlorosene, Povidone-Iodine, Sodium
Hypochlorite, Sodium Iodate, Symclosene, Thymol Iodide,
Triclocarban, Triclosan e Troclosene Potassium;

Compostos de mercúrio tais como Hydragaphen,
15 Meralein Sodium, Merbromin, Mercuric Chloride, Mercuric
Chloride, Ammoniated, Mercuric Sodium p-Phenolsulfonate,
Mercuric Succinimide, Mercuric Sulfide, Red, Mercurophen,
Mercurous Acetate, Mercurous Chloride, Mercurous Iodide,
Nitromersol, Potassium Tetraiodomercurate(II), Potassium
20 Triiodomercurate(II) Solution, Thimerfonate Sodium e
Thimerosal;

Nitrofuranos tais como Furazolidone, 2-
(Methoxymethyl)-5-nitrofurán, Nidroxyzone, Nifuroxime,
Nifurzide e Nitrofurazone;

25 Fenóis tais como Acetomerocetol, Bithionol, Cadmium
Salicylate, Carvacrol, Chloroxylenol, Clorophene, Cresote,
Cresol(s), p-Cresol, Fenticlor, Hexachlorophene, 1-Naphthyl
Salicylate, 2-Naphthyl Salicylate, 2,4,6-Tribromom-cresol, e
3',4',5'-Trichlorosalicylanilide;

30 Quinolinas tais como Aminoquinuride, Benzoxiquine,
Broxyquinoline, Chloroxine, Chlorquinaldol, Cloxyquin,
Ethylhydrocupreine, Euprocín, Halquinol, Hydrastine, 8-
Hydroxquinoline, 8-Hydroxquinoline Sulfate e

Iodochlorhydroxyquin; e

Outros, tais como Aluminum Acetate Solution, Aluminum Subacetate Solution, Aluminum Sulfate, 3-Amino-4-hydroxybutyric Acid, Boric Acid, Chlorhexidine, Chloroazodin, m-Cresyl Acetate, Cupric Sulfate, Dibromopropamidine, Ichthammol, Negatol⁷, Noxytiolin, Ornidazole, β -Propiolactone, α -Terpineol;

Drogas antiespasmódicas tais como Alibendol, Ambucetamide, Aminopromazine, Apoatropine, Bevonium Methyl Sulfate, Bietamiverine, Butaverine, Butropium Bromide, N-Butylscopolammonium Bromide, Caroverine, Cimetropium Bromide, Cinnamedrine, Clebopride, Coniine Hydrobromide, Coniine Hydrochloride, Cyclonium Iodide, Difemerine, Diisopromine, Dioxaphetyl Butyrate, Diponium Bromide, Drofenine, Emepronium Bromide, Ethaverine, Feclemine, Fenalamide, Fenoverine, Fenpiprane, Fenpiverinium Bromide, Fentonium Bromide, Flavoxate, Flopropione, Gluconic Acid, Guaiactamine, Hydramitrazine, Hymecromone, Leiopyrrole, Mebeverine, Moxaverine, Nafiverine, Octamylamine, Octaverine, Pentapiperide, Phenamacide Hydrochloride, Phloroglucinol, Pinaverium Bromide, Piperilate, Pipoxolan Hydrochloride, Pramiverin, Prifinium Bromide, Properidine, Propivane, Propyromazine, Prozapine, Racefemine, Rociverine, Spasmolytol, Stilonium Iodide, Sultroponium, Tiemonium Iodide, Tiquizium Bromide, Tiropramide, Trepibutone, Tricromyl, Trifolium, Trimebutine, N,N-1Trimethyl-3,3-diphenyl-propylamine, Tropenzile, Trospium Chloride e Xenytropium Bromide;

Drogas antitrombóticas tais como Anagrelide, Argatroban, Cilostazol, Chrysoptin, Daltroban, Defibrotide, Enoxaparin, Fraxiparine⁷, Indobufen, Lamoparan, Ozagrel, Picotamide, Plafibrade, Reviparin, Tedelparin, Ticlopidine, Triflusal e Warfarin;

Drogas antitussígenas tais como Allocamide, Amicibone, Benproperine, Benzonatate, Bibenzonium Bromide, Bromoform, Butamirate, Butethamate, Caramiphen Ethanedisulfonate, Carbetapentane, Chlophedianol, Clobutinol, 5 Cloperastine, Codeine, Codeine Methyl Bromide, Codeine N-Oxide, Codeine Phosphate, Codeine Sulfate, Cyclexanone, Dextromethorphan, Dibunate Sodium, Dihydrocodeine, Dihydrocodeinone Enol Acetate, Dimemorfan, Dimethoxanate, α, α -Diphenyl-2-piperidinepropanol, Dropropizine, Drotebanol, 10 Eprazinone, Ethyl Dibunate, Ethylmorphine, Fominoben, Guaiiapate, Hydrocodone, Isoaminile, Levopropoxyphene, Morclofone, Narceine, Normethadone, Noscapine, Oxeladin, Oxolamine, Pholcodine, Picoperine, Pipazethate, Piperidione, Prenoxdiazine Hydrochloride, Racemethorphan, Taziprinone 15 Hydrochloride, Tipepidine e Zipeprol;

Drogas antiulcerativas tais como Aceglutamide Aluminum Complex, ϵ -Acetamidocaproic Acid Zinc Salt, Acetoxolone, Arbaprostil, Benexate Hydrochloride, Bismuth Subcitrate Sol (Dried), Carbenoxolone, Cetraxate, Cimetidine, 20 Enprostil, Esaprazole, Famotidine, Ftaxilide, Gefamate, Guaiazulene, Irsogladine, Misoprostol, Nizatidine, Omeprazole, Ornoprostil, γ -Oryzanol, Pifarnine, Pirenzepine, Plaunotol, Ranitidine, Rioprostil, Rosaprostol, Rotraxate, Roxatidine Acetate, Sofalcone, Spizofurone, Sucralfate, 25 Teprenone, Trimoprostil, Thrithiozine, Troxipide e Zolimidine;

Drogas antiurolíticas tais como Acetohydroxamic Acid, Allopurinol, Potassium Citrate e Succinimide;

Drogas de antivenina tais como Lyovac7 Antivenin;

30 Drogas antivirais, incluindo: Purinas e pirimidinonas tais como Acyclovir, Cytarabine, Dideoxyadenosine, Dideoxycytidine, Dideoxyinosine, Edoxudine,

Floxuridine, Ganciclovir, idoxuridine, inosine Pranobex, MADU, Penciclovir, Trifluridine, Vidrarbine e Zidovudine; e

Outros, tais como Acetylleucine Monoethanolamine, Amantadine, Amidinomyacin, Cosalane, Cuminaldehyde
 5 Thiosemicarbazone, Foscarnet Sodium, Imiquimod, Interferon- α , Interferon- β , Interferon- γ , Kethoxal, Lysozyme, Methisazone, Moroxydine, Podophyllotoxin, Ribavirin, Rimantadine, Stallimycin, Statolon, Tromantadine e Xenazoic Acid;

Drogas antiansiolíticas, incluindo: Arilpiperazinas
 10 tais como Buspirone, Gepirone, Ipsapirone e Tondospirone;

Derivados de benzodiazepina tais como Alprazolam, Bromazepam, Camazepam, Chlordiazepoxide, Clobazam, Clorazepate, Chotiazepam, Cloxazolam, Diazepam, Ethyl
 15 Loflazepate, Etizolam, Fluidazepam, Flutazolam, Flutoprazepam, Halazepam, Ketazolam, Lorazepam, Loxapine, Medazepam, Metaclazepam, Mexazolam, Nordazepam, Oxazepam, Oxazolam, Pinazepam, Prazepam e Tofisopam;

Carbamatos tais como Cyclarbamate, Emylcamate, Hydroxyphenamate, Meprobamate, Phenprobamate e Tybamate; e
 20 Outros, tais como Alpidem, Benzoctamine, Captodiamine, Chiormezanone, Etifoxine, Flesinoxan, Fluoresone, Glutamic Acid, Hydroxyzine, Lesopitron, Mecloralurea, Mephenoalone, Mirtazepine, Oxanamide, Phenaglycodol, Suriclone e Zatosetron;

25 Antagonistas de benzodiazepina tais como Flumazenil;

Broncodilatadores, incluindo: Derivados de efedrina tais como Albuterol, Bambuterol, Bitolterol, Carbuterol, Clenbuterol, Clorprenaline, Dioxethedrine, Ephedrine,
 30 Epiniphrine, Eprozinol, Etafedrine, Ethylnorepinephrine, Fenoterol, Hexoprenaline, Isoetharine, Isoproterenol, Mabuterol, Metaproterenol, N-Methylephedrine, Pirbuterol, Procaterol, Protokylol, Reproterol, Rimiterol, Salmeterol,

Soterenol, Terbutaline e Tulobuterol;

Compostos de amônio quaternário tais como Bevonium Methyl Sulfate, Clutropium Bromide, Ipratropium Bromide e Oxitropium Bromide;

5 Derivados de xantina tais como Acefylline, Acefylline Piperazine, Ambuphylline, Aminophylline, Bamifylline, choline Theophyllinate, Doxofylline, Dyphylline, Enprofylline, Etamiphyllin, Etofylline, Guaithylline, Proxiphylline, Theobromine, 1-Theobromineacetic Acid e
10 Theophylline; e

Outros, tais como Fenspiride, Medibazine, Montekulast, Methoxyphenanime, Tretoquinol e Zafirkulast;

Bloqueadores do canal de cálcio, incluindo: Arilalquilaminas tais como Bepridil, Diltiazem, Fendiline,
15 Gallopanil, Prenylamine, Terodiline e Verapamil;

Derivados de diidropiridina tais como Felodipine, Isradipine, Nicardipine, Nifedipine, Nilvadipine, Nimodipine, Nisoldipine e Nitrendipine;

Derivados de piperazina tais como Cinnarizine,
20 Flunarisine e Lidoflazine; e

Outros, tais como Bencyclane, Etafenone e Perhexiline;

Reguladores de cálcio tais como Calcifediol, Calcitonin, Calcitriol, Clodronic Acid, Dihydrotachysterol,
25 Elcatonin, Etidronic Acid, Ipriflavone, Pamidronic Acid, Parathyroid Hormone e Teriparatide Acetate;

Cardiotônicos tais como Acefylline, Acetyldigitoxins, 2-Amino-4-picoline, Amrinone, Benfurodil Hemisuccinate, Buclasdesine, Cerberoside, Camphotamide,
30 Convallatoxin, Cymarin, Denopamine, Deslanoside, Ditalin, Digitalis, Digitoxin, Digoxin, Dobutamine, Dopamine, Dopexamine, Enoximone, Erythrophleine, Fenalcomine, Gitalin, Gitoxin, Glycocyamine, Heptaminol, Hydrastinine, Iopamine,

Lanotodises, Metamivam, Milrinone, Neriifolin, Oleandrin, Ouabain, Oxyfedrine, Prenalterol, Proscillaridin, Resibufogenin, Scillaren, Scillarenin, Strophanthin, Sulmazole, Theobromine e Xamoterol;

5 Agentes quelantes tais como Deferozmine, Ditiocarb Sodium, Edetate Calcium Disodium, Edetate Disodium, Edeate Sodium, Edetate Trisodium, Penicillamine, Pentetate Calcium Trisodium, Pentectic Acid, Succimer e Trientine;

 Antagonistas de colicistoquinina tais como
10 Proglumide;

 Agentes colelitólíticos tais como Chenodiol, Methyl tert-Butyl Ether, Monoctanoïn e Ursodiol;

 Coleréticos tais como Alibendol, Anethole Trithion, Azintamide, Cholic Acid, Cicrotoic Acid, Clanobutin,
15 Cyclobutyrol, Cyclovalone, Cynarin(e), Dehydrocholic Acid, Deoxycholic Acid, Dimecrotic Acid, α -Ethylbenzyl Alcohol, Exiproben, Feguprol, Fencibutirol, Fenipentol, Florantyrone, Hymecromone, Menbutone, 3-(o-Methoxyphenyl)-2-phenylacrylic Acid, Metochalcone, Moquizone, Osalmid, Ox Bile Extract,
20 4,4'-Oxydi-2-butanol, Piprozolin, Prozapine, 4-Salicyloylmorpholine, Sincalide, Taurocholic Acid, Timonacic, Tocamphyl, Trepibutone e Vanitiolide;

 Agentes colinérgicos tais como Aceclidine, Acetylcholine Bromide, Acetylcholine Chloride, Aclatonium
25 Napadisilate, Benzpyrinium Bromide, Bethanechol chloride, Carbachol, Carpronium chloride, Demecarium Bromide, Dexpanthenol, Diisopropyl Paraaxon, Echothiophate Iodide, Edrophonium chloride, Eseridine, Furtrethonium, Isoflurophate, Methacholine chloride, Muscarine, Neostigmine,
30 Oxapropanium Iodide, Physostigmine e Pyridostigmine Bromide;

 Inibidores de colinesterase tais como Ambenonium Chloride, Distigmine Bromide e Galanthamine;

 Reativadores de colinesterase tais como Obidoximine

Chloride e Pralidoxime Chloride;

Estimulantes e agentes do sistema nervoso central tais como Amineptine, Amphetimine, Amphetaminil, Bemegrade, Benzphetamine, Brucine, Caffeine, Chlorphentermine, 5 Clofenciclan, Clortermine, Coca, Demanyl Phosphate, Dexoadrol, Dextroamphetamine Sulfate, Diethylpropion, N-Ethylamphetamine, Ethamivan, Etifelmin, Etryptamine, Fencamfamine, Fenethylline, Fenosolone, Flurothyl, Galanthamine, Hexacyclonate Sodium, Homocamfin, Mazindol, 10 Megexamide, Methamphetamine, Methylphenidate, Nikethamide, Pemoline, Pentylenetetrazole, Phenidimetrazine, Phenmetrazine, Phentermine, Picrotoxin, Pipradrol, Prolintane e Pyrovalerone;

Descongestionantes tais como Amidephrine, 15 Cafaminol, Cyclopentamine, Ephedrine, Epinephrine, Fenoxazoline, Indanazoline, Metizoline, Naphazoline, Nordefrin Hydrochloride, Octodrine, oxymetazoline, Phenylephrine Hydrochloride, Phenylpropanolamine Hydrochloride, Phenylpropylmethylamine, Propylhexedrine, 20 Pseudoephedrine, Tetrahydrozoline, Tymazoline e Xylometazoline;

Agentes dentais, incluindo: Bifosfonatos (doença anti-periodontal e reabsorção óssea) tais como Alendronate, Clodronate, Etidronate, Pamidronate e Tiludronate; 25 Profiláticos Carries tais como Arginine e Sodium Fluoride;

Agentes dessensibilizantes tais como Potassium Nitrate e Citrate Oxalate;

Despigmentadores tais como Hydroquinine, Hydroquinone e Monobenzene;

30 Diuréticos, incluindo: Organomercurianos tais como Chlormerodrin, Meralluride, Mercamphamide, Mercaptomerin Sodium, Mercumallylic Acid, Mercumatilin Sodium, Mercurous Chloride e Mersalyl;

Pteridinas tais como Furterene e Triamterene;
 Purinas tais como Acefylline, 7-Morpholinomethyltheophylline, Pamabrom, Protheobromine e Theobromine;

5 Esteróides tais como Canrenone, Oleandrin e Spironolactone;

Derivados de sulfonamida tais como Acetazolmide, Ambuside, Azosemide, Bumetanide, Butazolamide, Chloraminophenamide, Clofenamide, Clopamide, Clorexolene, 10 Diphenylmethane-4,4'-disulfonamide, Disulfamide, Ethbxyzolamide, Furosemide, Indapamide, Mefruside, Methazolamide, Piretanide, Quinethazone, Torasemide, Tripamide e Xipamide;

Uracilas tais como Aminometradine e Amisometradine;
 15 Outros, tais como Amanozine, Amiloride, Arbutin, Chlorazanyl, Ethacrynic Acid, Etozolin, Hydracarbazine, Isosorbide, Mannitol, Metochalcone, Muzolimine, Perhexiline, Ticrynafene e Urea;

Agonistas do receptor de dopamina tais como
 20 Bromocriptine, Dopexamine, Fenoldopam, Iopamine, Lisuride, Naxagolide e Pergolide;

Ectoparasiticidas tais como Amitraz, Benzyl Benzoate, Carbaryl, Crotamiton, DDT, Dixanthogen, Isobornyl Thiocynoacetate-Technical, Lime Sulfurated Solution, 25 Lindane, Malathion, Mercuric Oleate, Mesulphen e Sulphur-Pharmaceutical;

Enzimas, incluindo: Enzimas digestivas tais como α -Amylase (Pâncreas de Suíno), Lipase, Pancrelipase, Pepsin e Rennin;

30 Enzimas mucolíticas tais como Lysozyme;

Enzimas que desativam a penicilina tais como Penicillinase; e

Enzimas proteolíticas tais como Collagenase,

Chymopapain, quimotripsinas, Papain e Trypsin;

Indutores de enzimas (hepáticas) como Flumecinol;

Estrogênios, incluindo: Estrogênios não-esteroidais tais como Benzestrol, Boparoestrol, Chlorotrianisene, 5 Dienestrol, Diethylstilbestrol, Diethylstilbestrol Dipropionate, Dimestrol, Fosfestrol, Hexestrol, Methallenestril e Methestrol; e

Estrogênios esteroidais tais como Colpormon, Conjugated Estrogenic Hormones, Equilenin, Equilin, 10 Estradiol, Estradiol Benzoate, Estradiol 17 β -Cypionate, Estriol, Estrone, Ethinyl Estradiol, Mestranol, Moxestrol, Mytatrienediol, Quinestradiol e Quinestrol;

Inibidores da secreção gástrica tais como Enterogastrone e Octreotide;

15 Glucocorticóides tais como 21-Acetoxypropfenolone, Aalclometasone, Algestone, Amicinonide, Beclomethasone, Betamethasone, Budesonide, Chloroprednisone, Clobetasol, Blovetasone, Clocortolone, Cloprednol, Corticosterone, Cortisone, Cortivazol, Deflazacort, Desonide, Desoximetasone, 20 Dexamethasone, Diflorasone, Diflucortolone, Difluprednate, Enoxolone, Fluazacort, Flucloronide, Flumehtasone, Flunisolide, Fluocinolone Acetonide, Fluocinonide, Fluocortin Butyl, Fluocortolone, Fluorometholone, Fluperolone Acetate, Fluprednidene Acetate, Fluprednisolone, Flurandrenolide, 25 Formocortal, Halcinonide, Halometasone, Halopredone Acetate, Hydrocortamate, Hydrocortisone, Hydrocortisone Acetate, ydrocortisone Phosphate, Hydrocortisone 21-Sodium Succinate, Hydrocortisone Tebutate, Mazipredone, Medrysone, Meprednisone, Methyolprednisolone, Mometasone Furoate, 30 Paramethasone, Prednicarbate, Prednisolone, Prednisolone 21-Diethylaminoacetate, Prednisone Sodium Phosphate, Prednisolone Sodium Succinate, Prednisolone Sodium 21-m-Sulfobenzoate, Prednisolone 21-Stearoylglycolate,

Prednisolone Tebutate, Prednisolone 21-Trimethylacetate, Prednisone, Prednival, Prednylidene, Prednylidene 21-Diethylaminoacetate, Tixocortal, Triamcinolone, Triamcinolone Acetonide, Triamcinolone Benetonide e Triamcinolone Hexacetonide;

Princípios estimulantes das gônadas tais como Buserelin, Clomiphene, Cyclofenil, Epimestrol, FSH, HCG e LH-RH;

Hormônios gonadotrópicos tais como LH e PMSG;

Inibidores do hormônio do crescimento tais como Octreotide e Somatostatin;

Fatores de liberação do hormônio do crescimento tais como Semorelin;

Estimulantes do crescimento tais como Somatotropin;

Agentes hemolíticos tais como Phenylhydrazine e Phenylhydrazine Hydrochloride;

Antagonistas de heparina tais como Hexadimethrine Bromide e Protamines;

Hepatoprotetores tais como S-Adenosylmethionine,

Betaine, Catechin, Citolone, Malotilate, Orazamide, Phosphorylcholine, Protoporphyrin IX, Silymarin-Group, Thiotic Acid e Tiopronin;

Imunomoduladores tais como Amiprilose, Bucillamine, Ditiocarb Sodium, Inosine Pranobex, Interferon- γ ,

Interleukin-2, Lentinan, Muroctasin, Platonin, Procodazole, Tetramisole, Thymomodulin, Thymopentin e Ubenimex;

Imunossupressores tais como Azathioprine, Cyclosporins e Mizoribine;

Resinas de troca iônica tais como Carbacrylic Resins, Cholestyramine Resin, Colestipol, Polidexide, Resodec e Sodium Polystyrene Sulfonate;

Hormônio estimulante da lactação tais como Prolactin;

Agonistas de LH-RH tais como Buserelin, Goserelin, Leuprolide, Nafarelin, e Triptorelin;

Agentes lipotrópicos tais como N-Acetylmethionine, Choline Chloride, Choline Dehydrocholate, Choline Dihydrogen
5 Citrate, Inositol, Lecithin e Methionine;

Supressores de lúpus eritematoso tais como Bismuth Sodium Triglycollamate, Bismuth Subsalicylate, Chloroquine e Hydroxychloroquine;

Corticóides minerais tais como Aldosterone,
10 Deoxycorticosterone, Deoxycorticosterone Acetate e Fludrocortisone;

Drogas mióticas tais como Carbachol, Physostigmine, Pilocarpine e Pilocarpus;

Inibidores da oxidase de monoamina tais como
15 Deprenyl, Iproclozide, Iproniazid, Isocarboxazid, Moclobemide, Octomoxin, Pargyline, Phenelzine, Phenoxypropazine, Pivalylbenzhydrazine, Prodipine, Toloxatone e Tranylcypromine;

Agentes mucolíticos tais como Acetylcysteine,
20 Bromhexine, Carbocysteine, Domiodol, Letosteine, Lysozyme, Mecysteine Hydrochloride, Mesna, Sobrerol, Stepronin, Tiopronin e Tyloxapol;

Relaxantes musculares (esqueletais) tais como Afloqualone, Alcuronium, Atracurium Besylate, Baclofen,
25 Benzoctamine, Benzoquinonium Chloride, C-Calebassine, Carisoprodol, Chlormezanone, Chlorphenesin Carbamate, Chlorproethazine, Chlozoxazone, Curare, Cyclarbate, Cyclobenzaprine, Dantrolene, Decamethonium Bromide, Diazepam, Eperisone, Fazadinium Bromide, Flumetramide, Gallamine
30 Triethiodide, Hexacarbacholine Bromide, Hexafluorenium Bromide, Idrocilamide, Lauexium Methyl Sulfate, Leptodactyline, Memantine, Mephenesin, Mephenoxalone, Metaxalone, Methocarbamol, Metocurine Iodide, Nimetazepam,

Orphenadrine, Pancuronium Bromide, Phenprobamate, Phenylramidol, Pipecurium Bromide, Promoxolane, Quinine Sulfate, Styramate, Succinylcholine Bromide, Succinylcholine Chloride, Succinylcholine Iodine, Suxethonium Bromide, 5 Tetrazepam, Thiocolchicoside, Tizanidine, Tolperisone, Tubocurarine Chloride, Vecuronium Bromide e Zoxolamine;

Antagonistas narcóticos tais como Amiphenazole, Cyclazocine, Levallorphan, Nadide, Nalmfene, Nalorphine, Nalorphine Dinicotinate, Naloxone e Naltrexone;

10 Agentes neuroprotetores tais como Dizocilpine;

Agentes nootrópicos tais como Aceglutamide, Acetylcarnitine, Aniracetam, Bifematlane, Exifone, Fipexide, Idebenone, Indeloxazone Hydrochloride, Nizofenone, Oxiracetam, Piracetam, Propentofylline, Pyritinol e Tacrine;

15 Agentes oftálmicos tais como 15-ketoprostaglandins;

Hormônio ovariano tal como Relaxin;

Drogas oxitócicas tais como Carboprost, Cargutocin, Deaminoxitytocin, Ergonovine, Gemeprost, Methylergonovine, Oxytocin, Pituitary (Posterior), Prostaglandin E₂,

20 Prostaglandin F_{2a} e Sparteine;

Inibidores de pepsina tais como Sodium Amylosulfate;

Estimulantes peristálticos tais como Cisapride;

Progestogênios tais como Allylestrenol, Anagestone, 25 Chlormadinone Acetate, Delmadinone Acetate, Demegestone, Desogestrel, Dimethisterone, Dydrogesterone, Ethisterone, Ethynodiol, Flurogestone Acetate, Gestodene, Gestonorone Caproate, Haloprogesterone, 17-Hydroxy-16-methylene--progesterone, 17 α -Hydroxyprogesterone, 17 α -Hydroxygesterone, 30 Caproate, Lynestrenol, Medrogestone, Medroxyprogesterone, Megestrol Acetate, Melengestrol, Norethindrone, Norethynodrel, Norgesterone, Norgestimate, Norgestrel, Norgestrienone, Norvinisterone, Pentagestrone, Progesterone,

Promegestone, Quingestrone e Trengestone;

Inibidores de prolactina tais como Metergoline;

Prostaglandinas e análogos de prostaglandina tais como Arbaprostil, Carboprost, Enprostil, Bemeproost, 5 Limaprost, Misoprostol, Ornoprostil, Prostacyclin, Prostaglandin E₁, Prostaglandin E₂, Prostaglandin F_{2a}, Rioprostil, Rosaprostol, Sulprostone e Trimoprostil;

Inibidores de protease tais como Aprotinin, Camostat, Gabexate e Nafamostat;

10 Estimulantes respiratórios tais como Almitrine, Bemegrade, Carbon Dioxide, Cropropamide, Crotethamide, Dimeflin, Dimorpholamine, Doxapram, Ethamivan, Fominoben, Lobeline, Mepixanox, Metamivam, Nikethamide, Picrotoxin, Pimeclon, Pyridofylline, Sodium Succinate e Tacrine;

15 Agentes antiesclerosantes tais como Ethanolamine, Ethylamine, 2-Hexyldecanoic Acid, Polidocanol, Quinine Bisulfate, Quinine Urea Hydrochloride, Sodium Ricinoleate, Sodium Tetradecyl Sulfate e Tribenoside;

20 Sedativos e hipnóticos, incluindo: Ureídas acíclicas tais como Acecarbromal, Apronalide, Bomisovalum, Capuride, Carbromal e Ectylurea;

Álcoois tais como Chlorhexadol, Ethchlorvynol, Meparfynol, 4-Methyl-5-thiazoleethanol, tert-Pentyl Alcohol e 2,2,2-Trichloroethanol;

25 Amidas tais como Butoctamide, Diethylbromoacetamide, Ibrotamide, Isovaleryl Diethylamide, Niaprazine, Tricetamide, Trimetozine, Zolpidem e Zopiclone;

Derivados de ácido barbitúrico tais como Allobarbitol, Amobarbitol, Aprobarbitol, Barbitol, 30 Brallabarbitol, Butabarbitol Sodium, Butalbital, Butallylonal, Butethal, Carbubarb, Cyclobarbitol, Cyclopentobarbitol, Enallylpropymal, 5-Ethyl-5-(1-piperidyl) barbituric Acid, 5-Furfuryl-5-isopropylbarbituric Acid,

Heptabarbital, Hexethal Sodium, Hexobarbital, Mephobarbital, Methitural, Narcobarbital, Nealbarbital, Pentobarbital Sodium, Phenallymal, Phenobarbital, Phenobarbital Sodium, Phenylmethylbarbituric Acid, Probarbital, Propallylonal, 5 Proxibarbital, Reposal, Secobarbital Sodium, Talbutal, Tetrabarbital, Vinbarbital Sodium e Vinylbital;

Derivados de benzodiazepina tais como Brotizolam, Doxefazepam, Estazolam, Flunitrazepam, Flurazepam, Haloxazolam, Loprazolam, Lormetazepam, Nitrazepam, Quazepam, 10 Temazepam e Triazolam;

Bromidas tais como Ammonium Bromide, Calcium Bromide, Calcium Bromolactobionate, Lithium Bromide, Magnesium Bromide, Potassium Bromide e Sodium Bromide;

Carbamatos tais como Amyl Carbamate-Tertiary, 15 Ethinamate, Hexapropylmate, Meparfynol Carbamate, Novonal e Trichlorourethan;

Derivados de cloral tais como Carbocloral, Chloral Betaine, Chloral Formamide, Chloral Hydrate, Chloralantipyrine, Dichloralphenazone, Pentaerythritol 20 Chloral e Triclofos;

Piperidinadionas tais como Glutehimide, Methypyrilone, Piperidione, Pyridyldione, Taglutimide e Thalidomide;

Derivados de quinazolona tais como Etaqualone, 25 Mecloqualone e Methaqualone; e

Outros, tais como Acetal, Acetophenone, Aldol, Ammonium Valerate, Amphenidone, d-Bornyl α -Bromoisovalerate, d-Bornyl Isovalerate, Bromoform, Calcium 2-Ethylbutanoate, Carfinat, α -Chlorolose, Clomethiazole, Cypridipium, 30 Doxylamine, Etodroxizine, Etomidate, Fenadiazole, Homofenazine, Hydrobromic Acid, Meclozamine, Menthyl Valerate, Opium, Paraldehyde, Perlamine, Propiomazine, Rilmazafone, Sodium Oxybate, Sulfonethylmethane e

Sulfonmethane;

Agentes trombolíticos tais como APSAC, Plasmin, Pro-Urokinase, Streptokinase, Tissue Plasminogen Activator e Urokinase;

5 Hormônios tirotrópicos tais como TRH e TSH;

Uricosúricos tais como Benzbromarone, Ethebenecid, Orotic Acid, Oxycinchophen, Probenecid, Sulfinpyrazone, Ticrynafen e Zoxazolamine;

10 Vasodilatadores (cerebrais) tais como Bencyclane, Cinnarizine, Citicoline, Cyclandelate, Ciclonicate, Diisopropylamine Dichloracetate, Eburnamoline, Fenoxedil, Flunarizine, Ibudilast, Ifenprodil, Nafronyl, Nicametate, Nicergoline, Nimodipine, Papaverine, Pentifylline, Tinofedrine, Vincamine, Vinpocetine e Viquidil;

15 Vasodilatadores (coronários) tais como Amotriphene, Bendazol, Benfurodil Hemisuccinate, Benziodarone, Chloacizine, Chromonar, Clobenfurol, Cionitrate, Dilazep, Dipyridamole, Droprenilamine, Efloxate, Erythritol, Erythrityl Tetranitrate, Etafenone, Fendiline, Floredil, 20 Ganglefene, Hexestrol Bis(β -diethylaminoethyl ether), Hexobendine, Itramin Tosylate, Khellin, Lidoflazine, Mannitol Hexanitrate, Medibazine, Nicorandil, Nitroglycerin, Pentaerythritol Tetranitrate, Pentrinitrol, Perhexiline, Pimefylline, Prenylamine, Propatyl Nitrate, Pyridofylline, 25 Trapidil, Tricromyl, Trimetazidine, Trolnitrate Phosphate e Visnadine;

Vasodilatadores (periféricos) tais como Aluminum Nicotinate, Bamethan, Bencyclane, Betahistine, Bradykinin, Brovincamine, Bufoniode, Buflomedil, Butalamine, Cetiedil, 30 Ciclonicate, Cinepazide, Cinnarizine, Cyclandelate, Diisopropylamine Dichloracetate, Eledoisin, Fenoxidil, Flunarizine, Heronicate, Ifenprodil, Inositol Niacinate, Isoxsuprine, Kallidin, Kallikrein, Moxisylyte, Nafronyl,

Nicametate, Nicergoline, Nicofuranose, Nicotiny Alcohol, Nylidrin, Pentifylline, Pentoxifylline, Piribedil, Protaglandin E₁, Suloctidil e Xanthinal Niacinate;

Vasoprotetores tais como Benzarone, Bioflavonoids, Chromocarb, Clobeoside, Diosmin, Dobesilate Calcium, Escin, Rolescutol, Leucocyanidin, Metescufylline, Quercetin, Rutin e Troxerutin;

Vitaminas, fontes de vitaminas e extratos de vitaminas tais como Vitaminas A, B, C, D, E, e K e derivados destas, Calciferols, Glycyrrhiza e Mecobalamin;

Agentes vulneráveis tais como Acetilcysteine, Allantoin, Asiaticoside, Cadexomer Iodine, Chitin, Dextranomer e Oxaceprol;

Anticoagulantes tais como a heparina;

Diversos como Erythropoietin (Hematínico), Filgrastim, Finasteride (Hipertrofia Benigna da Próstata) e Interferon β 1- α (Esclerose Múltipla).

Em determinadas realizações, o agente a ser aplicado é uma ou mais proteínas, hormônios, vitaminas ou minerais. Em determinadas realizações, o agente a ser aplicado é selecionado entre insulina, IGF-1, testosterona, vinpocetina, hexarelina, GHRP-6 ou cálcio. Em determinadas realizações, as composições contêm dois ou mais agentes.

A lista acima de agentes ativos é com base nessas categorias e espécies de drogas determinadas nas páginas THER-1 a THER-28 do The Merck Index, 12th Edition, Merck & Co. Rahway, N.J. (1996). Esta referência é incorporada a título de referência na presente invenção em sua totalidade.

D. Utilizações das composições

As aplicações terapêuticas e diagnósticas das microesferas incluem a aplicação de drogas, vacinação, terapia de genes e geração de imagens de tecido ou de tumor *in vivo*. As vias de administração incluem a administração

oral ou parenteral; administração mucosal; administração oftálmica; injeção intravenosa, subcutânea ou intra-articular ou injeção intramuscular; administração por inalação; e administração tópica.

5 As doenças e os distúrbios podem incluir, mas não se limitam a distúrbios neurais, distúrbios respiratórios, distúrbios do sistema imunológico, distúrbios musculares, distúrbios reprodutores, distúrbios gastrintestinais, distúrbios pulmonares, distúrbios digestivos, distúrbios metabólicos, distúrbios cardiovasculares, distúrbios renais, 10 distúrbios proliferativos, doenças cancerosas e inflamação.

 As micropartículas providas na presente invenção podem ser utilizadas para tratar doenças infecciosas, tais como infecções arbovirais, botulismo, brucelose, candidíase, 15 campilobacteriose, catapora, clamídia, cólera, infecções por coronavírus, infecções por staphylococcus, infecções por coxsackievírus, doença de Creutzfeldt-Jakob, criptosporidiose, infecção por ciclospora, infecções por citomegalovírus, infecção pelo vírus de Epstein-Barr, febre 20 do dengue, difteria, infecções do ouvido, encefalite, infecções pelo vírus influenza, infecções pelo vírus parainfluenza, giardíase, gonorréia, infecções por Haemophilus influenzae, infecções por hantavírus, hepatite viral, infecções pelo vírus herpes simplex, HIV/AIDS, 25 infecção por helicobacter, infecções por papilomavírus humano (HPV), mononucleose infecciosa, legionelose, lepra, leptospirose, listeriose, doença de Lyme, coriomeningite linfocítica, malária, sarampo, febre hemorrágica de Marburg, meningite, varíola símia, caxumba, infecção por 30 micobactérias, infecção por micoplasma, infecção pelo vírus de Norwalk, coqueluche, infecção por oxiúros, doença pneumocócica, infecção por Streptococcus pneumoniae, infecção por Mycoplasma pneumoniae, infecção por Moraxella

catarrhalis, infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, infecção por rotavírus, psitacose, hidrofobia, infecção pelo vírus sincitial respiratório (RSV), tinea, febre maculosa das Montanhas Rochosas, rubéola, salmonelose, SARS, escabiose, 5 doenças sexualmente transmissíveis, shigelose, herpes-zóster, esporotricose, infecções estreptocócicas, sífilis, tétano, triquinose, tuberculose, tularemia, febre tifóide, meningite viral, meningite bacteriana, infecção pelo vírus do Nilo Ocidental, febre amarela, zoonoses por iersiniose e quaisquer 10 outras doenças infecciosas do trato respiratório, pulmonar, dermatológico, gastrointestinal e urinário.

Outras doenças e condições incluem artrite, asma, condições alérgicas, doença de Alzheimer, cânceres, doença cardiovascular, esclerose múltipla (EM), doença de Parkinson, 15 fibrose cística (FC), diabetes, hepatite não-viral, hemofilia, distúrbios de coagulação, distúrbios sangüíneos, distúrbios genéticos, distúrbios hormonais, doenças renais, doenças hepáticas, distúrbios neurológicos, doenças metabólicas, doenças de pele, doenças da tiróide, 20 osteoporose, obesidade, acidente vascular cerebral, anemia, doenças inflamatórias e doenças autoimunes.

E. Combinações, Kits, Artigos de Manufatura

As combinações e os kits que contêm as combinações providas na presente invenção incluindo as micropartículas ou 25 ingredientes para a formação de micropartículas tais como uma proteína ou outras macromoléculas, contraíons, solventes, tampões ou sais e incluindo opcionalmente instruções para a administração são providos. As combinações incluem, por exemplo, as composições tal como provido na presente invenção 30 e os reagentes ou as soluções para a diluição das composições a uma concentração desejada para a administração a um indivíduo hospedeiro, incluindo os seres humanos. As combinações também podem incluir as composições tal como

provido na presente invenção e os agentes terapêuticos e/ou nutritivos adicionais, incluindo as drogas, tal como provido na presente invenção.

São providos adicionalmente na presente invenção os kits que contêm as combinações e opcionalmente as instruções descritas acima para a administração pelas vias oral, subcutânea, transdermal, intravenosa, intramuscular, oftálmica ou outras, dependendo da proteína e do agente adicional opcional a ser aplicado.

As composições providas na presente invenção podem ser acondicionadas como artigos de manufatura que contêm o material de acondicionamento, uma composição provida na presente invenção e uma etiqueta que indique que a composição, por exemplo, uma formulação DAS181, é formulada para a aplicação oral, pulmonar ou outra.

Os artigos de manufatura providos na presente invenção podem conter materiais de acondicionamento. Os materiais de acondicionamento para a utilização no acondicionamento de produtos farmacêuticos são bem conhecidos pelos elementos versados na técnica. Vide, por exemplo, as Patentes Norte-americanas N°. 5.323.907, 5.052,558 e 5.033.252. Os exemplos de materiais de acondicionamento farmacêuticos incluem, mas não são limitados a sacos de bolhas, frascos, tubos, inaladores, bombas, sacolas, frascos, recipientes, garrafas e qualquer material de acondicionamento apropriado para uma formulação selecionada e um modo pretendido de administração e de tratamento.

Os seguintes exemplos são incluídos para finalidades ilustrativas somente e não se prestam a limitar o âmbito da invenção.

EXEMPLO 1

Preparação de microesferas da proteína de fusão de sialidase, DAS181

A. Purificação de DAS181

DAS181 é uma proteína de fusão que contém o domínio de ligação da heparina (glicosaminoglicano ou GAG) da anfirregulina humana fundida através de seu N-término ao C-término de um domínio catalítico de *Actinomyces viscosus* (seqüência de aminoácido determinada na SEQ ID N°. : 17). A proteína DAS181 foi purificada como descrito em Malakhov et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1470-1479, 2006, que é incorporado em sua totalidade a título de referência na presente invenção. Resumidamente, a codificação do fragmento do DNA para DAS181 foi clonada no vetor de plasmídeo pTrc99a (Pharmacia; SEQ ID N°. : 16) sob o controle de um IPTG (promotor de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo indutível). O construto resultante foi expressa na cepa BL21 de *Escherichia coli* (*E. coli*).

As células de *E. coli* que contém o construto expresso foram lisadas pela sonicação em 50 mM de tampão de fosfato, pH 8,0; 0,3 M de NaCl e 10% de glicerol. O lisato clarificado foi passado através de uma coluna de SP-Sepharose. As proteínas foram eluídas a partir da coluna com tampão de lise que continha 0,8 M de NaCl. A fração eluída de SP-Sepharose foi ajustada a 1,9 M de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), clarificada por centrifugação e carregada em uma coluna de butil-Sepharose. A coluna foi lavada com dois volumes de 1,3 M de (NH₄)₂SO₄ e a proteína de fusão DAS181 foi eluída com 0,65 M de (NH₄)₂SO₄.

Para a etapa final, a cromatografia de exclusão de tamanho foi executada em Sephacryl S-200 equilibrado com solução salina tamponada por fosfato (PBS). A pureza da proteína foi determinada como sendo mais de 98%, como avaliado pela eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio, pela cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa e pelo ensaio imunossorvente ligado a

enzimas com os anticorpos gerados contra as proteínas da célula de E. coli. A DAS181 purificada, peso molecular de 44.800 Da, foi dializada contra 2 mM de tampão de acetato de sódio, pH 5,0.

5 B. Atividade de DAS181

A atividade de sialidase de DAS181 foi medida utilizando o substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil-N-acetil- α -D-ácido neuramínico (4-MU-NANA; Sigma). Uma unidade de sialidase é definida como a quantidade de enzima que
10 libera 10 nmol de UM-NANA em 10 minutos a 37°C (50 mM de tampão de CH₃COOH-NaOH, ao pH 5,5) em uma reação que contém 20 nmol de 4-UM-NANA em um volume de 0,2 ml (Potier et al., Anal. Biochem., 94:287-296, 1979). A atividade específica de DAS181 foi determinada como sendo de 1.300 U/mg
15 de proteína (0,77 de μ g de proteína de DAS181 por unidade de atividade).

C. Preparação de microesferas utilizando DAS181 purificada

DAS181 (10 mg/ml), purificada e preparada tal como
20 descrito sob a Seção A acima, foi utilizada par formar coquetéis de 200 μ l tal como mostrado abaixo. Os coquetéis continham glicina ou citrato como contraíons e isopropanol como o solvente orgânico, como segue:

- 25 1) DAS181 + 5 mM de glicina, pH 5,0;
- 2) DAS181 + 5 mM de glicina, pH 5,0 + 10% de isopropanol;
- 3) DAS181 + 5 mM de citrato de sódio, pH 5,0;
- 4) DAS181 + 5 mM de citrato de sódio, pH 5,0 + 10% de isopropanol;

30 Tubos de microcentrífuga plásticos contendo os coquetéis com ingredientes tal como descrito acima em 1) - 4) foram refrigerados gradualmente:

- (a) da temperatura ambiente (de aproximadamente

25°C) a 4°C ao colocar os coquetéis em um refrigerador, seguido por:

(b) resfriamento a -20°C ao colocar o coquetel resultante de (a) em um freezer, seguido por:

5 (c) congelamento a -80°C ao colocar o coquetel resultante de b) em um freezer.

Sob condições mais favoráveis, esperou-se que as microesferas se formassem entre aproximadamente 4°C a aproximadamente -20°C (geralmente na faixa de aproximadamente
10 -2°C a aproximadamente -15°C). O congelamento a -80°C é realizado para remover os ingredientes do coquetel à exceção das microesferas (por exemplo, solvente, etc.) por meio de secagem por congelamento. O coquetel 4) foi preparado em triplicata, duas alíquotas em tubos plásticos e uma em um
15 tubo de vidro. Uma alíquota (em um tubo plástico) foi refrigerada como descrito acima, sendo que as duas outras alíquotas (uma em um tubo plástico e uma em um tubo de vidro) foram submetidas à resfriamento/congelamento rápidos ao mergulhar os tubos em nitrogênio líquido.

20 Quando do congelamento, todos os tubos foram colocados no liofilizador e os voláteis (água e isopropanol) foram removidos por sublimação, tornando as pelotas secas.

Resultados: As pelotas secas recuperadas dos coquetéis tratados como descrito acima foram testadas quanto
25 à presença de microesferas. Das amostras acima, as microesferas com boas características de dispersividade, com aproximadamente 2 micra (μm) de tamanho, foram observadas somente com o coquetel 4) que contém o contraíon do citrato e o isopropanol e foram submetidas ao resfriamento gradual. A
30 glicina do contraíon não se mostrou mais favorável para a proteína DAS181 (coquetel 2), mostrando uma mistura de cristais similares a vidro e aglomerados com somente algumas microesferas. Quando nenhum solvente orgânico estava

presente, a massa similar a vidro da proteína liofilizada de DAS 181 foi obtida e nenhuma microesfera foi observada (coquetéis 1) e 3)). O congelamento rápido do coquetel 4 em um tubo de vidro produziu cristais similares a vidro e nenhuma microesfera, sendo que o congelamento rápido do coquetel 4 em um tubo plástico (a taxa de resfriamento é ligeiramente mais lenta devido a uma difusão mais lenta do calor através do plástico do que através do vidro) produziu microesferas aglomeradas.

Este exemplo demonstra que as microesferas com distribuição de tamanho estreita e boa dispersividade (aglomeração mínima) podem ser produzidas por uma combinação de proteína, contraíon, solvente orgânico apropriada e de resfriamento gradual, utilizando os métodos providos na presente invenção.

EXEMPLO 2

Tamanho das microesferas de DAS181 como uma função da concentração de solvente orgânico

A DAS181 foi purificada e utilizada para preparar microesferas tal como descrito acima no Exemplo 1 (vide o coquetel 4)), utilizando uma combinação de proteína DAS181 (10 mg/ml), contraíon de citrato (citrato de sódio, 5 mM) e solvente orgânico de isopropanol (10%, 20% ou 30%). As soluções de coquetel resultantes foram refrigeradas da temperatura ambiente (de aproximadamente 25°C) a 4°C, seguido por resfriamento a -20°C, seguido por congelamento a -80°C, tal como descrito no Exemplo 1. Quando do congelamento a -80°C, os tubos foram colocados em um liofilizador e os voláteis (água e isopropanol) foram removidos por sublimação, deixando um pó seco que contém microesferas.

Resultados: A formação de microesfera foi observada com todas as três concentrações: 10%, 20% ou 30% do solvente orgânico de isopropanol. As dimensões das microesferas

variaram, no entanto, dependendo da concentração do solvente orgânico. Os tamanhos das microesferas tal como determinado em comparação às partículas a uma grade em um hemocitômetro foram estimados como sendo de 2 micra utilizando 10% de isopropanol, 4 micra utilizando 20% de isopropanol e 5-6 micra utilizando 30% de isopropanol. Estes resultados demonstram que o tamanho das micropartículas pode ser projetado conforme desejado, utilizando uma concentração de solvente orgânico apropriada.

10 EXEMPLO 3

Tamanho das microesferas de DAS181 como uma função da concentração de proteína

A DAS181 foi purificada e utilizada para preparar microesferas tal como descrito acima no Exemplo 1 (vide o coquetel 4)), utilizando uma combinação de proteína DAS181 (5 mg/ml ou 10 mg/ml), contraíon de citrato (citrato de sódio, 5 mM) e isopropanol (5% ou 20%). As soluções de coquetel resultantes foram refrigeradas da temperatura ambiente (de aproximadamente 25°C) a 4°C, seguido pela resfriamento a -20°C, seguido por congelamento a -80°C, tal como descrito no Exemplo 1. Quando do congelamento a -80°C, os tubos foram colocados em um liofilizador e os voláteis (água e isopropanol) foram removidos por sublimação, deixando um pó seco que contém microesferas.

Resultados: A formação de microesfera foi observada com ambas as concentrações de proteína (5 mg/ml e 10 mg/ml) e ambas as concentrações de solvente orgânico (5% ou 20%). As dimensões das microesferas variaram, no entanto. Os coquetéis que contêm 5 mg/ml de proteína ou 10 mg/ml de proteína e 5% de isopropanol produziram microesferas estimadas como tendo aproximadamente 1,5 micra de tamanho. O coquetel que contém 5 mg/ml de proteína e 20% de isopropanol produziu microesferas de um tamanho estimado de aproximadamente 3 micra, sendo que

o coquetel que contém 10 mg/ml de proteína e 20% de isopropanol produziu microesferas com um tamanho estimado de aproximadamente 4 micra. Estes resultados demonstram que o tamanho das micropartículas pode ser projetado conforme desejado, utilizando uma concentração de proteína apropriada, ou uma combinação da concentração de solvente orgânico e concentração de proteína apropriada.

EXEMPLO 4

Tamanho das microesferas DAS181 como uma função da concentração de contraíon

A DAS181 foi purificada e utilizada para preparar microesferas tal como descrito acima no Exemplo 1 (vide o coquetel 4)), utilizando uma combinação de proteína DAS181 (10 mg/ml), contraíon de citrato (citrato de sódio; 2 mM, 3 mM ou 6 mM) e isopropanol (20%). As soluções de coquetel foram misturadas em frascos de vidro e foram refrigeradas de +20°C a -40°C em uma rampa de congelamento de 1°C por minuto em um liofilizador Millrock Laboratório Series. Os voláteis (água e isopropanol) foram removidos por sublimação a 100 mTorr com a secagem primária a -30°C por 12 horas e a secagem secundária a 30°C por 3 horas, deixando um pó seco que contém microesferas.

Resultados: A formação de microesfera foi observada em todas as três concentrações de contraíon de citrato testadas. O tamanho das microesferas aumentou de 1 micron em 2 mM de citrato, a 3 micra em 3 mM de citrato, a 5 micra em 6 mM de citrato. A adição de 1 mM de acetato do sódio ou de 1 mM de cloreto de sódio ao coquetel que contém 2 mM de citrato não afetou a formação das microesferas provocada pelo contraíon de citrato. Estes resultados demonstram que o tamanho das micropartículas pode ser projetado conforme desejado, utilizando uma concentração de contraíon apropriada.

EXEMPLO 5

Microesferas DAS181 formadas na presença de tensoativos

A adição de tensoativos às microesferas macromoleculares (por exemplo, de proteína) pode
5 freqüentemente aprimorar as características das microesferas, tornando-as apropriadas para a administração a um indivíduo, tais como a capacidade de fluxo, a dispersividade e a disposição para uma via de administração particular, tal como a inalação intranasal ou oral. Para testar se os tensoativos
10 podem ser incorporados nos métodos de manufatura das microesferas, tal como provido na presente invenção, a produção das microesferas DAS181 foi empreendida tal como descrito no Exemplo 1 acima, exceto que, adicionalmente, um tensoativo foi adicionado à solução.

15 A uma solução de coquetel que contém 5 mg/ml de DAS181, 5 mM de citrato de sódio e 20% de isopropanol, foram adicionados um tensoativo (3,5% em peso/peso de lecitina, 0,7% em peso/peso de Span-85® [trioleato de sorbitano] ou 3,5% em peso/peso de ácido oléico). As microesferas foram
20 formadas pela resfriamento das soluções a 4°C, seguido pela resfriamento a -20°C, seguido pelo congelamento a -80°C para a liofilização, tal como descrito acima no Exemplo 1. Quando do congelamento, os tubos foram colocados em um liofilizador e os voláteis (água e isopropanol) foram removidos por
25 sublimação, deixando um pó seco que contém microesferas.

Resultados: As microesferas que resultam do tratamento de cada um dos coquetéis acima tal como descrito acima foram espalhadas em lâminas de vidro utilizando lamínulas friccionadas em um movimento circular. A formação
30 eficiente de microesfera foi observada em todos os casos. Quando as amostras que continham tensoativo foram comparadas à amostra que continha todos os ingredientes restantes, mas nenhum tensoativo adicionado, observou-se que as microesferas

formadas na presença de tensoativo tinham dispersividade aprimorada (aglomeração ou agregação menor).

EXEMPLO 6

Preparação de microesferas de albumina de soro bovino (BSA) pela seleção de tipos e concentrações apropriados de solventes orgânicos e de contraíons

Conforme descrito na presente invenção, os métodos providos na presente invenção podem ser empiricamente otimizados no formato de efluência elevada para obter microesferas que têm as características desejadas incluindo o tamanho, a capacidade de fluxo e a dispersividade. A finalidade desta experiência foi demonstrar que ao variar os tipos e as concentrações de solventes orgânicos e de contraíons, bem como o pH do coquetel, o tamanho e a qualidade das microesferas de uma proteína de interesse, neste caso, a albumina de soro bovino (BSA), podem ser ajustados.

As soluções de coquetel que contêm 5 mg/ml de BSA e vários solventes orgânicos e contraíons no pH e nas concentrações indicados (vide a Tabela 1) foram colocadas em uma placa de microtitulação (volume final por cavidade de 0,1 ml). Os coquetéis foram refrigerados de +20°C a -40°C em uma rampa de congelamento de 1°C por minuto em um liofilizador Millrock Laboratório Series. Os voláteis foram removidos por sublimação a 100 mTorr, com uma secagem primária a -30°C por 12 horas e uma secagem secundária a 30°C por 3 horas.

Resultados: Os resultados são mostrados na Tabela 1 abaixo. Para a proteína de BSA, as combinações (de contraíon e de solvente orgânico, respectivamente) que produziram as microesferas mais uniformes com cristalização ou agregação mínima incluem:

- (1) citrato + isopropanol
- (2) citrato + acetona

(3) ácido itacônico + 1-propanol

(4) glicina + dioxano

(5) glicina + 1-propanol

(6) rubídio + 1-propanol

5

(7) perclorato + 1-propanol

Tabela 1: Seleção de rendimento elevado de microesferas de BSA formadas sob condições diferentes

Contraíón	pH	Solvente Orgânico	Descrição do produto
5 mM de ácido piválico	4,0	5% de Ciclohexanol	microesferas de 0,5-1 micron com cristais ocasionais
5 mM de ácido piválico	4,0	5% de 1- propanol	microesferas de 0,5-1 micron com alguns agregados
5 mM de ácido piválico	4,0	5% de álcool butílico	microesferas agregadas
5 mM de ácido piválico	4,0	5% de p-dioxano	microesferas agregadas
5 mM cloreto de rubídio	9,0	5% de Ciclohexanol	microesferas de 0,5-1. Agregados e com cristais ocasionais
5 mM de cloreto de rubídio	9,0	5% de 1-propanol	microesferas de 0,5-1 micron
5 mM de cloreto de rubídio	9,0	5% butil alcohol	Poucas microesferas (0,5-1 micron). Principalmente agregados e cristais
5 mM de cloreto de rubídio	9,0	5% de p-dioxano	microesferas de 1- 2 micron com alguns agregados
5 mM de brometo sódio	4,0	5% de Ciclohexanol	microesferas de 1-2 micron com alguns agregados
5 mM de brometo sódio	4,0	5% de 1-propanol	Poucas microesferas (0,5-2 micron). Principalmente agregados e cristais
5 mM de brometo sódio	4,0	5% de álcool butílico	Poucas microesferas (0,5-1 micron). Principalmente agregados e cristais
5 mM de	4,0	5% de p-dioxano	microesferas de 1- 2

brometo de sódio			mícron com alguns some agregados
5 mM de perclorato de sódio	4,0	5% de Ciclohexanol	microesferas de 0,5-2 mícron com alguns cristais e agregados
5 mM de perclorato de sódio	4,0	5% de 1-propanol	microesferas de 0,5-1 mícron
5 mM de perclorato de sódio	4,0	5% de álcool butílico	Poucas microesferas de 1-2 mícron. Principalmente cristais e agregados
5 mM de perclorato de sódio	4,0	5% de p-dioxano	microesferas agregadas
5 mM de fosfato de cálcio	4,0	5% de Ciclohexanol	Poucas microesferas de 1-2 mícron, principalmente agregados
5 mM de fosfato de cálcio	4,0	5% de 1-propanol	microesferas de 1-2 mícron com alguns agregados
5 mM de fosfato de cálcio	4,0	5% de álcool butílico	Poucas microesferas de 1-2 mícron. Principalmente cristais e agregados
5 mM de fosfato de cálcio	4,0	5% de p-dioxano	Microesferas agregadas
5 mM de trietilamina	9,0	5% de Ciclohexanol	microesferas de 0,5-1 mícron com alguns cristais e agregados
5 mM de trietilamina	9,0	5% de 1-propanol	microesferas de 1-2 mícron com alguns agregados
5 mM de trietilamina	9,0	5% de álcool butílico	Poucas microesferas de 1-2 mícron. Principalmente cristais e agregados
5 mM de trietilamina	9,0	5% de p-dioxano	microesferas agregadas
5 mM de glicina	9,0	5% de Ciclohexanol	microesferas de 0,5-1 com alguns cristais e agregados
5 mM de glicina	9,0	5% de 1-propanol	microesferas de 0,5-2 mícron com agregados ocasionais
5 mM de	9,0	5% de álcool	Poucas microesferas

glicina		butílico	de 1-2 micron. Principalmente cristais e agregados
5 mM de glicina	9,0	5% de p-dioxano	microesferas de 1-2 micron
5 mM de citrato de sódio	4,0	15% de isopropanol	microesferas de 1-2 micron
5 mM de citrato de sódio	4,0	15% de acetona	microesferas de 0,5-1 micron
5 mM de ácido itacônico	4,0	15% de 1-propanol	microesferas de 1-2 micron

Estes resultados demonstram que, para cada proteína, múltiplas formulações podem ser selecionadas imediatamente para a melhor formação de microesferas (dimensões desejadas, uniformidade, dispersividade, agregação mínima e formação de cristais, etc.) no formato de elevado-rendimento. As combinações dos reagentes e das condições (contraíon, solvente orgânico, pH, concentrações) selecionados da seleção inicial podem então ser ainda passar por um ajuste fino tal como desejado.

10 EXEMPLO 7

Preparação de microesferas utilizando uma variedade de proteínas

Os métodos aqui apresentados podem ser utilizados para preparar microesferas utilizando uma variedade de proteínas. Além da DAS181 e da BSA exemplificadas acima, foram utilizados métodos para preparar microesferas de tripsina, hemoglobina, dNase I, lisozima, ovalbumina, rNase A, inibidor de proteinase humana etiquetada com hexahistidina 8 (PI8, que tem a seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°. : 15), proteína fluorescente vermelha (RFP) e proteína fluorescente verde (GFP).

A dNase I, a tripsina e a hemoglobina foram compradas junto à Worthington. A lisozima, a ovalbumina e a

rNase A foram compradas junto à Sigma. A purificação de PI8 etiquetada com 6xHis, GFP e RFP: PI8 etiquetada com 6xHis, GFP e RFP foram expressas e purificadas essencialmente tal como descrito para DAS181 no Exemplo 1 acima, com as seguintes modificações:

Purificação de GFP etiquetada com 6xHis e RFP etiquetada com 6xHis: Os construtos que codificam a proteína fluorescente vermelha e a proteína fluorescente verde com etiquetas His6 de N-terminal foram expressas em E. coli como proteínas etiquetadas com 6xHis. A expressão da proteína fluorescente vermelha foi prosseguida durante toda a noite no meio LB com 1 mM de IPTG. A proteína fluorescente verde foi induzida por três 3 horas no meio TB com 1 mM de IPTG. Os lisatos de células de 4 litros de culturas induzidas foram clarificados através de centrifugação e as proteínas foram purificadas através de pelo cromatografia de afinidade de quelato de metal em resina de quelação de fluxo rápido (GE Healthcare) carregada com níquel e acondicionada em colunas C-10 (GE Healthcare).

As proteínas ainda foram purificadas através de cromatografia com filtração de gel em uma coluna Sefacryl 200 de 0,5 cm x 70 cm equilibrada com solução salina tamponada com fosfato. As proteínas foram dializadas contra 2 mM de tampão de acetato de sódio, pH 5,0, e concentradas em um Centriprep (Amicon).

Purificação de PI8 etiquetada com 6xHis: Um construto que codifica PI8 com uma etiqueta His6 de N-terminal foi expresso em E. coli como PI etiquetada com 6xHis. A purificação foi executada tal como descrito para 6xHis RFP e 6xHis GFP acima, com a exceção de que todos os tampões utilizados nas várias etapas cromatográficas de purificação continham 1 mM de TCEP (cloridreto de Tris(2-carboxietil)fosfina).

Preparação das microesferas: Soluções de coquetel contendo 5

mg/ml de proteína e vários contraíons, solventes orgânicos e um pH tal como listado abaixo foram preparadas em uma placa de microtitulação tal como descrito acima no Exemplo 6.

Tabela 2: Combinações utilizadas para produzir microesferas de proteínas diferentes

Proteína	Contraíon	pH	Solvente Orgânico	Tamanho da Microesfera (mícron)
Tripsina	5 mM de arginina	8,0	5% de isopropanol	0,5 - 1
Lisoзима	5 mM de citrato	8,0	5% de isopropanol	4 - 5
PIN 168 (PI8)	5 mM de citrato	5,0	7% de isopropanol	2 - 5
DNase I	5 mM de citrato	4,0	5% de isopropanol	0,4 - 1
RNase A	5 mM de citrato	4,0	5% de isopropanol	0,4 - 1
Hemoglobina	5 mM de glicina	5,0	10% de isopropanol	0,4 - 0,7
Ovalbumin	5 mM de ácido piválico	4,0	10% de isopropanol	0,5 - 1
Proteína fluorescente vermelha	5 mM de ácido piválico	7,0	10% de propanol	1 - 4 (agregados ocasionais)
Proteína fluorescente verde	5 mM de ácido piválico	7,0	10% de propanol	0,5 - 1,5

A placa de microtitulação foi resfriada de +20°C a -40°C em uma rampa de congelamento de 1°C por minuto em um liofilizador Millrock Lab Series. Os componentes voláteis (água e isopropanol) foram removidos através de sublimação a 100 mTorr com secagem primária a -30°C por doze horas e secagem secundária a 30°C por três horas, restando o pó seco que contém as microesferas.

Os pós secos foram espalhados em lâminas de vidro e o microfotografia foi executada através de uma objetiva de 32x ou então de 100x. Todas as combinações listadas na Tabela 2 acima produziram microesferas de boa qualidade

(distribuição de tamanho uniforme, dispersividade, com poucos agregados e/ou cristais). As microesferas variaram no tamanho de aproximadamente 0,4 a 1 milímicron (rNase A, dNase I) a aproximadamente 2 a 5 micra (6xHis PI8, lisozima), dependendo da proteína. Este exemplo demonstra que os métodos aqui apresentados podem ser utilizados para produzir microesferas a partir de uma ampla variedade de proteínas.

EXEMPLO 8

Distribuição de tamanho de partícula aerodinâmica de microesferas DAS181 para a inalação: uma comparação dos métodos aqui apresentados com a secagem por aspersão

Tal como aqui descrito, os métodos aqui apresentados podem ser utilizados para produzir microesferas em qualquer faixa desejada de tamanho, incluindo uma faixa de aproximadamente 0,5 micron a aproximadamente 6-8 micra para a aplicação através de inalação.

A. Preparação das microesferas

Para testar a distribuição de tamanho de partícula aerodinâmica de pó seco de DAS181 (microesferas) formulado para a aplicação por inalação, microesferas de DAS181 foram preparadas utilizando dois métodos tal como segue:

(a) Uma solução aquosa de DAS181 que contém 14 mg/ml de DAS181, 5 mM de citrato de sódio, pH 5,0, foi secada por aspersão em uma corrente de ar a 55°C, para produzir microesferas.

(b) Alternativamente, microesferas de DAS181 foram produzidas de acordo com os métodos aqui apresentados. A uma solução aquosa de DAS181 que contém 14 mg/ml de DAS181, 5 mM de citrato de sódio, pH 5,0, foi adicionado isopropanol a 5% como solvente orgânico. A solução resultante foi resfriada de +20°C a -40°C em uma rampa de congelamento de 1°C por minuto em um liofilizador Millrock Lab Series. Os componentes voláteis (água e isopropanol) foram removidos através de

sublimação a 100 mTorr com secagem primária a -30°C por doze horas e secagem secundária a 30°C por três horas, restando o pó seco que contém microesferas.

5 B. Distribuição de tamanho de partícula aerodinâmica das microesferas

As microesferas preparadas tal como descrito no Exemplo 8A foram testadas por Impacto de Cascata Andersen. A deposição de compostos farmacêuticos no trato respiratório pode ser predita pelo comportamento aerodinâmico das
10 partículas (microesferas) nos estágios/placas de coleta do impactador de cascata.

A experiência do impacto de cascata foi executada utilizando as microesferas de DAS181 preparadas por um dos dois métodos alternativos descritos na seção A acima, isto é,
15 pela secagem por aspersão ou pelos métodos aqui apresentados. As microesferas (10 mg) foram carregadas em cápsulas de gelatina. As cápsulas de gelatina foram colocadas em um inalador de pó seco CycloHaler (FarmaChemie) e sujeitadas ao impacto de cascata. Um impactador de cascata não-viável de
20 oito estágios Andersen (Thermo Electron, Boston) modificado para ser utilizado a 90 litros por minuto do fluxo de ar e equipado com uma garganta USP, cone de indução e nenhum pré-separador, foi utilizado. As placas de coleta do impactador que representam várias áreas/estágios pós-inalação de
25 deposição (traquéia, brônquios principais e secundários, brônquios terminais, alvéolos, etc.) foram revestidas com uma aspersão de silício para impedir o rebote das microesferas. As microesferas dos estágios e das placas de coleta foram recuperadas em uma solução salina tamponada com fosfato
30 contendo 0,1% de Tween, e a quantidade de DAS181 depositada recuperada de cada estágio e placa de coleta foi quantificada ao medir a absorbância a 280 nm.

Resultados: O tamanho geométrico das microesferas

produzidas pelos dois métodos foi avaliado através de microscopia luminosa e foi verificado que eles são essencialmente idênticos (uma faixa de 1,5 - 3,0 micra) para ambos os métodos. Conforme mostrado na Tabela 3 abaixo, no entanto, a distribuição de tamanho de partícula aerodinâmica dos dois preparados difere significativamente entre os dois métodos. Para as microesferas produzidas de acordo com um método tal como aqui apresentado (isto é, o método (b) tal como indicado na seção A acima), menos de 25% permaneceu preso na boca (garganta/cone do conjunto do impactador), ao passo que mais de 70% das microesferas foram aplicadas à traquéia e aos pulmões (com mais de 40% nos brônquios terminais e nos alvéolos). Em comparação, menos de 50% das microesferas de DAS181 formadas através de secagem por aspersão (método (a) tal como indicado na seção A acima) foi aplicado à traquéia e aos pulmões (menos de 20% nos brônquios terminais e nos alvéolos). Os resultados demonstram que os métodos aqui apresentados podem produzir microesferas para a aplicação em pulmões profundos, e que as microesferas produzidas pelos métodos aqui apresentados têm propriedades superiores de desfazer aglomerações e de fluidez (propiciam uma dose de aplicação mais alta) em comparação às microesferas produzidas por um método de secagem por aspersão.

Tabela 3: Resultados de análises de impacto de cascata das microesferas de DAS181

			Porcentagem de Deposição de DAS181	
Componente do Impactador de Cascata Andersen	Corte de tamanho correspondente (micron)	Deposição esperada nas vias aéreas respiratórias	Microesferas Produzidas pelo Método (a) (isto é, Secagem por aspersão)	Microesferas Produzidas pelo Método (b)
Garganta + Cone	>10	cavidade oral	42,9	16,6
-2 (S + P)	8,0 - 10	cavidade oral	3,7	4,9

-1 (S + P)	6,5 – 8,0	Orofaringe	5,9	5,5
-0	5,2 – 6,5	Faringe	5,8	4,0
1	3,5 – 5,2	traquéia/brônquios	12,5	9,3
2	2,6 – 3,5	Brônquios secundários	11,6	12,6
3	1,7 – 2,6	Brônquios terminais	11,0	24,0
4	1,0 – 1,7	alvéolos	4,5	19,2
5	0,43 – 1,0	alvéolos	1,4	3,5

EXEMPLO 9

Manufatura em grande escala de microesferas

Este exemplo demonstra que os métodos aqui apresentados podem ser escalados para a manufatura de grandes quantidades de DAS181. O processo descontínuo aqui descrito é apropriado para a manufatura de microesferas de pó seco de alta qualidade em uma quantidade que varia, por exemplo, de miligramas a aproximadamente um quilograma, e é limitado pela capacidade do tanque de mistura e/ou do espaço de prateleira do liofilizador. Um processo "contínuo" alternativo aqui descrito pode ser utilizado para manufaturar quantidades que variam, por exemplo, de ecentenas de gramas a cem ou mais quilogramas (100 gramas a 100 quilogramas ou mais). A vantagem adicional do processo contínuo é um controle melhor sobre o resfriamento do coquetel.

A manufatura em grande escala por um processo descontínuo ou por um processo contínuo pode seguir, por exemplo, uma ou mais das etapas descritas abaixo em qualquer combinação de etapas ou métodos alternativos específicos:

Precipitação da proteína em microesferas. Esta etapa pode ser executada em um modo descontínuo ao colocar a solução de coquetel que contém a concentração desejada da proteína, o solvente orgânico e o contraíon na(s) bandeja(s) de liofilização e ao colocar a(s) bandeja(s) em prateleiras do liofilizador. Alternativamente, as bandejas podem ser esfriadas e congeladas em uma plataforma esfriada ou um outro tipo de equipamento (por exemplo, um freezer) e armazenadas por um período de tempo, congeladas e liofilizadas

posteriormente. Alternativamente, as microesferas podem ser formadas pela precipitação em um vaso com agitação, em que o vaso é colocado em uma superfície fria ou uma bobina de resfriamento imersa em líquido ou enquanto o coquetel é recirculado através de um trocador de calor utilizando uma bomba peristáltica. Alternativamente, as microesferas podem ser formadas através de precipitação em um modo contínuo, ao passar a solução de coquetel através de um trocador(es) de calor uma vez ao utilizar uma bomba peristáltica.

10 Remoção do líquido a granel. A suspensão das microesferas pode ser concentrada utilizando centrifugação padrão, centrifugação de fluxo contínuo (por exemplo, CARR ViaFuge Pilot), ou a filtração (por exemplo, em fibra de vidro, vidro sinterizado, filtros de polímero, cartuchos ociosos de fibra (por exemplo, aqueles manufaturados pela GE Healthcare) ou cassetes de filtração de fluxo tangencial (cassetes TFF, tais como aqueles manufaturados pela Millipore ou Sartorius)). A remoção do líquido a granel (50% ou mais) pode resultar em um ciclo de secagem mais rápido e em uma

15

20 eficiência e rendimento mais elevados.

Secagem das microesferas. As microesferas recuperadas formadas por qualquer modo podem ser secadas por meio de liofilização convencional. Alternativamente, as microesferas podem ser secadas sob temperatura ambiente e pressão atmosférica, eliminando o uso do liofilizador.

25

Resultados: A proteína DAS181 foi processada com sucesso como pó seco (microesferas) por um modo contínuo tal como aqui descrito. O coquetel que contém 10 mg/ml de DAS181, isopropanol a 20% e 2 mM de sulfato de sódio foi passado através do trocador de calor 35 SERIES (Exergy, Garden City, NY) acoplado com um criostato de circulação NESLAB utilizando uma bomba peristáltica de modo que, durante a passagem, o coquetel foi resfriado de aproximadamente 25°C a

30

aproximadamente -12°C . A suspensão resultante das microesferas que saem do trocador de calor foi bombeada em uma bandeja de liofilização previamente esfriada (-40°C), congelada e liofilizada ou, alternativamente, bombeada
 5 diretamente em nitrogênio líquido e então liofilizada. As microesferas resultantes, que foram analisadas através de microscopia e impacto de cascata, revelaram ser microesferas uniformes com agregação mínima e boa dispersividade, e eram similares nas dimensões e na distribuição de tamanho de
 10 partícula aerodinâmica às microesferas produzidas pelo modo descontínuo. Quando a solução formulada do coquetel de DAS181 não foi esfriada (não foi passada através do trocador de calor, desse modo nenhuma precipitação das microesferas foi induzida) e despejada diretamente em nitrogênio líquido,
 15 nenhuma microesfera foi observada e, ao invés disto, cristais parecidos com vidro foram observados após a liofilização.

EXEMPLO 10

Processo de modo descontínua e formulação de microesferas DAS181 para a aplicação a vias aéreas respiratórias superior
 20 e central

Este exemplo descreve a formulação e um processo para a manufatura de microesferas de DAS181. Os teores da solução de coquetel de DAS181 e as suas quantidades relativas são mostrados na Tabela 4 abaixo.

25 Tabela 4: Fórmula de manufatura descontínua para microesferas de DAS181

Ingrediente	Quantidade para uma batelada ⁽¹⁾		Concentração final no coquetel formulado	Função
	Concentração da solução de partida	Quantidade adicionada		
DAS181 protein	19.55 g/l	3.306 l, solução de API	12 g/L	Ingrediente ativo
Acetato de sódio ⁽²⁾	1.12 mM		0.688 mM	pH buffer
Ácido acético ⁽²⁾	0.63 mM		0.0387 mM	pH buffer
Isopropanol	100% em volume/volume	0.269 l	5% em volume/volume	Micropartícula formação agent

Cloreto de cálcio	500 mM	0.0028 l	0.268 mM	Stability enhancing agent
Água para irrigação	Pura	1.79 l	NA	Diluent

(1) Tamanho de batelada: volume final do coquetel de 5,38 litros. Rendimento teórico de 74 g do pó seco de DAS181 a granel.

(2) Componentes da solução de partida da proteína DAS181 (API).

A. Produção da substância da droga a granel

Os termos substância da droga, ingrediente farmacêutico ativo e API são utilizados intercambiavelmente neste exemplo e se referem à proteína DAS181. A produção da proteína DAS181 a granel foi executada tal como segue. Primeiramente, quantidades volumosas de DAS181 foram expressas em E. coli (cepa BL21) essencialmente tal como descrito no Exemplo 1. As células de E. coli que expressam a proteína DAS181 foram lavadas através de diafiltração em uma etapa de lavagem de coleta de fermentação utilizando o tampão Toyopearl 1, o cartucho de fibra oco UFP-500-E55 (GE Healthcare) e uma bomba peristáltica Watson-Marlow.

A proteína DAS181 recombinante foi purificada a granel das células. As especificações detalhadas dos componentes e dos tampões utilizados na purificação a granel de DAS181 são fornecidas nas Tabelas 5 e 6 abaixo. As células colhidas e lavadas foram lisadas em uma etapa de homogenização ao passar as células duas vezes ao utilizar o disruptor de células Niro-Soave Panda. O homogenato obtido desse modo foi clarificado através de microfiltração ao utilizar o tampão Toyopearl 1, o cassete TFF Hydrosart de 0,2 micron e uma bomba Watson Marlow. O homogenato clarificado foi então concentrado, permitindo que o lisato fosse recirculado sem alimentação de tampão fresco. Em seguida, a

proteína DAS181 foi capturada do homogenato clarificado em uma resina Toyopearl SP-550c que foi lavada em uma série de tampões (vide a Tabela 5) antes que a proteína DAS181 fosse eluída da resina. A concentração de cloreto de sódio do eluato foi ajustada em 1,0 M em um tampão final de 50 mM de fosfato a um pH 8,0. O eluato contendo DAS181 foi passado então através de uma resina Toyopearl Hexyl-650C para uma purificação adicional utilizando um tampão Toyopearl 4. O eluato da resina que contém a proteína DAS181 foi então trocado com tampão em 5 mM de acetato de sódio em uma etapa de diafiltração (vide a etapa 8 na Tabela 5). A proteína concentrada foi passada em seguida através de um filtro Sartorius Q SingleSep remove a fim de remover o DNA em um modo de fluso passante. Isopropanol foi adicionado ao filtrado de Q SingleSep até uma concentração final de 20% em volume/volume. A proteína DAS181 no tampão foi passada através de uma resina Amberchrome CG300M equilibrada com um tampão Amberchrom (vide a etapa 11 na Tabela 5). A proteína DAS181 a granel purificada foi então trocada com tampão no tampão da formulação e concentrada através de diafiltração (vide a etapa 12 da Tabela 5).

Tabela 5: Purificação da substância da droga de DAS181 a granel

1	Finalidade	Lavagem de Coleta de Fermentação	Especificações
	Cartucho	GE UFP-500-E55	
	Atividade	Nome do Tampão	
	Diafiltração	Tampão Toyopearl 1	
			25-35

2	Finalidade	Homogenização	
	Atividade	Etapa	Nome do Tampão
	Equilibração	Equilibração	Tampão de coleta
	Homogenização 1ª Passagem		Carga da amostra
	Homogenização 2ª Passagem		Carga da amostra

3	Finalidade	Clarificação do Homogenato (Diafiltração)	Especificações
	Cartucho de TFF	HydroSart 10K 0,6 m ²	

	Atividade	Nome do Tampão	PSI de entrada
	Recirculação	Carga da amostra	40
	Diafiltração	Tampão Toyopearl 1	<50

4	Finalidade	Concentração de permeato	Especificações
	Cartucho de TFF	HydroSart 10K 0, m ²	
	Atividade	Nome do Tampão	PSI de entrada
	Recirculação	Carga da amostra	NS
	Concentração	Carga da amostra	<50

5	Finalidade	Captura de DAS181 executada em modo de aglutinação e eluição	
	Resina	Toyopearl SP-550C	
	Atividade	Etapa	Nome do Tampão
	Carga	Carga da amostra	Homogenato clarificado
	Lavagem	Lavagem SP 1	Tampão Toyopearl 1
		Lavagem SP 2	Tampão Toyopearl 2
		Lavagem SP 3	Tampão Toyopearl 3
		Lavagem SP 4	Tampão Toyopearl 2
		Lavagem SP 5	Tampão Toyopearl 1
	Eluição	Eluição	Tampão Toyopearl 4

6	Finalidade	Ajuste da Concentração de NaCl	
	Método	Adição de NaCl até 1,0 M	
	Tampão Final	50 mM de fosfato, 1,0 M de NaCl, pH 8,0	

7	Finalidade	Purificação de DAS181 no modo de fluxo passante	
	Resina	Toyopearl Hexyl-650C	
	Atividade	Etapa	Nome do Tampão
	Carga	Carga da amostra	Carga de hexila cond.

8	Finalidade	Concentração e Diafiltração	Especificações
	Cartucho de TFF	HydroSart 10K 0,6 m ²	
	Atividade	Nome do Tampão	Recirc. l/min*
	Recirculação	Tampão Toyopearl 6	15-16
	Concentração	Hexyl Product Pool	15-16
	Diafiltração	Tampão Toyopearl 6	15-16
	Recirculação	Tampão Toyopearl 6	NS

9	Finalidade	Remover o DNA no modo de fluxo passante	
	Resina	Filtro Sartorius Q SingleSep	
	Atividade	Etapa	Nome do Tampão
	Carga	Carga da amostra	

10	Finalidade	Ajuste do tampão	
	Método	Adição de Isopropanol até 20%	
	Tampão Final	5 mM de Acetato, 20% de Isopropanol, pH 5,0	

11	Finalidade	Polimento de DAS181 no modo de fluxo passante	
	Resina	Amberchrome CG300M	
	Atividade	Etapa	Nome do Tampão
	Carga	Carga da amostra	Carga Amberchrom

12	Finalidade	Concentração e Diafiltração	Especificações
	TFF Cartucho	HydroSart 10K 0,6 m ²	

Atividade	Nome do Tampão	Recirc. L/min*
Recirculação	Tampão da Formulação	15-16
Concentração	Poça de produto Amberchrom	15-16
Diafiltração	Tampão de Formulação	15-16

* Volumes em litros, exceto pelo fato que 4x denota os múltiplos do volume de reteentato

CV = Volumes de Coluna

NR = Não Registrado

5 NS = Não Especificado

Tabela 6: Tampões utilizados durante o processo de purificação de DAS181

Nome do Tampão	Composição do tampão
Tampão Toyopearl 1	50 mM de fosfato de potássio, 0,3 M de NaCl, pH 8,0
Tampão Toyopearl 2	1,1 mM fosfato de potássio, 2,9 mM de fosfato de sódio, 154 mM de NaCl, pH 7,4
Tampão Toyopearl 3	1,1 mM de fosfato de potássio, 2,9 mM de fosfato de sódio, 154 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS, 0,5% de deoxicolato de sódio, pH 7,4
Tampão Toyopearl 4	50 mM de fosfato de potássio, 1,0 M de NaCl, pH 8,0
Tampão Toyopearl 5	50 mM de fosfato de potássio, 0,5 M de NaCl, pH 8,0
Tampão Toyopearl 6	5 mM de acetate de sódio, pH 5,0
Tampão Toyopearl 7	5 mM de acetato de sódio, 60% de isopropanol, pH 5,0
Tampão da Formulação	1,75 mM de acetate de sódio, pH 5,0
3% de álcool isopropílico	3% isopropanol
Tampão Amberchrom	5 mM de acetate de sódio, 20% de isopropanol, pH 5,0 ajustado com ácido acético
1,0 N de NaOH, 3% de Isopropanol	1,0 N de NaOH, 3% de isopropanol
1,0 N de NaOH	1,0 N de NaOH
0,5 N de NaOH	0,5 N de NaOH
0,1 N de NaOH	0,1 N de NaOH
70% de álcool isopropílico	70% de isopropanol
20% EtOH	20% etil alcohol

B. Processo de Manufatura Descontínuo

Os ingredientes indicados na Tabela 4 foram combinados para formar microesferas de DAS181 em um processo descontínuo de larga escala tal como descrito abaixo.

Etapa I: Descongelamento da substância da droga a granel

0,2 µm da substância da droga filtrada a granel congelada em frascos de plástico foi descongelado durante toda a noite à temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$).

Etapa II: Pesagem dos excipientes e preparação das soluções

35,51 g do pó anidro de sulfato de sódio foram

pesados e Q.S. até 500 ml com água para irrigação, e agitados então para obter uma solução transparente. 18,38 g de pó diidratado de cloreto de cálcio pó foram pesados e Q.S. até 250 ml com água para irrigação, e então agitados para obter
5 uma solução transparente.

Etapa III: Preparação da solução de coquetel de DAS181

A 3,3 litros da substância da droga concentrada (19,55 g/l), 1,79 litro de água para irrigação foi adicionado lentamente com agitação, seguido por 0,0215 litro da solução
10 de sulfato de sódio, 0,0028 litro da solução de cloreto de cálcio e 0,269 litro de isopropanol. A solução foi agitada para assegurar a mistura completa dos componentes.

Etapa IV: Filtração da solução de coquetel formulada através de um filtro de 0,2 µm

15 A solução de coquetel formulada da etapa III foi filtrada através de um filtro de 0,2 µm em sacos de meio estéril para controlar os particulados e a biocarga.

Etapa V: Enchimento em bandejas de liofilização

A solução filtrada formulada foi despejada em
20 bandejas de liofilização Lyoguard em autoclave. Para assegurar um resfriamento uniforme da solução e a formação de microesferas de alta qualidade, foram preenchidas seis bandejas, cada uma delas com 0,9 litro ou menos da solução de coquetel.

25 Etapa VI: Congelamento e liofilização

As bandejas foram colocadas nas prateleiras do liofilizador (Hull 120FSX200) previamente esfriadas até $-45 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e a solução foi colocada para esfriar e congelar. A formação das microesferas ocorreu quando a solução estava
30 congelada. O congelamento foi prosseguido por uma a duas horas para assegurar a solidificação completa. A temperatura do produto foi verificada pela leitura dos termopares unidos a duas das seis bandejas.

As etapas do ciclo de liofilização são tal como segue:

a) Ajustar o vácuo a 160 micra e permitir a evacuação até 100 - 200 micra;

5 b) Elevar a temperatura da prateleira até +10°C por três horas;

c) Manter a temperatura da prateleira em +10°C por 36 horas (secagem primária);

10 d) Traços do termopar examinados para verificar se a fase de secagem primária está completada e a temperatura do produto estabilizada em 10°C $\pm$ 5°C por quinze a trinta horas.

e) Elevar a temperatura da prateleira até +30°C por uma hora e manter por três a cinco horas (secagem secundária).

15 Etapa VII: Transferência das microesferas de DAS181 a granel para o recipiente e misturação

Uma seção na película de fundo de cada bandeja de liofilização Lyoguard foi limpa utilizando lenços de limpeza e uma abertura de 3 x 3 cm foi feita com um bisturi. As
20 microesferas secas foram transferidas a um frasco de plástico. O frasco foi tampado e tombado quarenta vezes, mudando as direções com cada inversão. O tombamento era para assegurar a uniformidade do conteúdo do frasco. As amostras para o teste analítico foram tiradas e o frasco foi recapeado
25 e lacrado em sacos de plástico para a armazenagem.

No processo de manufatura de microesferas de DAS181 a granel tal como descrito acima, foi verificado que o sulfato é uma substância segura para ser utilizado como um contraíon, e produziu de maneira reproduzível microesferas
30 com uma distribuição de tamanho estreita. Além disso, o solvente orgânico isopropanol era uma boa escolha de solvente porque (1) é um solvente da classe 3, (2) pode produzir microesferas em uma ampla faixa (2 - 30%, em volume/volume)

de concentrações, e (3) tem um ponto de congelamento relativamente elevado de modo que os seus vapores podem ser presos eficientemente durante a liofilização.

A concentração da proteína na formulação final poderia ser variada (10 - 14 mg/ml), tal como poderia a concentração de contraíons (1 - 5 mM) e do isopropanol (2 - 30% em volume/volume), sem causar um impacto substancial nas propriedades físicas das microesferas ou na atividade da proteína DAS181 nas microesferas. A concentrações mais elevadas de isopropanol (15 - 30%), as microesferas formaram enquanto o coquetel ainda estava totalmente líquido. A concentrações mais baixas (2 - 15%), os cristais de gelo começaram a se formar primeiramente, seguidos pela precipitação para formar as microesferas.

15 C. Rendimento de DAS181 nas microesferas

O rendimento teórico de DAS181 nas microesferas secos é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

Rendimento teórico = proteína DAS181, g ÷ fração de proteína no pó seco (microesferas)

20 O valor da fração de proteína (0,866) foi estabelecido empiricamente pela análise de diversas bateladas manufaturadas de microesferas de DAS181. O rendimento teórico para as quantidades tal como indicado na Tabela 2 é de 64,56 g ÷ 0,866 = 74,55 g. Foi verificado que o rendimento real de pó seco de DAS181 é de 64 g.

Resultados: A adequabilidade das microesferas preparadas tal como descrito na seção B acima para a administração através de inalação oral foi testada por Impacto de Cascata Andersen. Os resultados são resumidos na Tabela 7 abaixo. A deposição de compostos farmacêuticos no trato respiratório pode ser predita pelo deposição das partículas (microesferas) nos estágios/placas de coleta do impactador de cascata. Para um composto farmacêutico, por

exemplo, microesferas de DAS181, que é administrado para a prevenção ou o tratamento das infecções virais que surgem no trato respiratório, tal como influenza, é desejável depositar o composto farmacêutico na garganta, na traquéia e nos 5 brônquios (vias aéreas respiratórias superior e central). A proteína de fusão DAS181 aplicada às vias aéreas respiratórias superior e central cliva os ácidos siálicos do receptor das membranas das mucosas, desse modo impedindo a ligação viral e a infecção nestes locais. Para a aplicação 10 ideal das microesferas de DAS181 aos locais onde a infecção viral respiratória pode ser iniciada, isto é, na garganta, na traquéia ou nos brônquios, as microesferas não devem ser (a) demasiadamente grandes que fiquem presas na extremidade dianteira na boca (isto é, as microesferas são demasiadamente 15 grandes, de aproximadamente 8 micra ou mais); ou (b) demasiadamente pequenas que são depositados nos pulmões profundos e absorvidas sistemicamente na corrente sanguínea (isto é, 0,5 micron ou menos). Para a aplicação de microesferas de DAS181 à garganta, à traquéia e aos 20 brônquios, uma faixa do tamanho de aproximadamente 1 micron a aproximadamente 5,5 - 6 micra é geralmente apropriada.

As microesferas de DAS181 manufaturadas tal como descrito acima foram caracterizadas pelo impacto de cascata Andersen e foi verificado que são apropriadas para a 25 aplicação às vias aéreas respiratórias superior e central com uma porcentagem suficientemente baixa (< 5%) depositada nos alvéolos.

Tabela 7: Distribuição de tamanho de partícula aerodinâmica de pó seco de DAS181 a 60 litros por minuto

Componente do impactador de cascata Andersen	Corte de tamanho correspondente, micron	Deposição esperada nas vias aéreas respiratórias	Proteína DAS181 depositada (em mg)	Porcentagem de proteína DAS181 total Recuperada
Inalador (Cyclohaler)			1,57 ± 0,11	20,13%

Garganta/Cone	> 10	Cavidade oral	$0,93 \pm 0,19$	11,92%
-1 (Estágio + Placa)	8,6 - 10	Cavidade oral	$0,50 \pm 0,10$	6,41%
-0 (Estágio + Placa)	6,5 - 8,6	Orofaringe	$0,40 \pm 0,03$	5,13%
1 (Estágio + Placa)	4,4 - 6,5	Faringe	$0,58 \pm 0,03$	7,44%
2 (Estágio + Placa)	3,3 - 4,4	Traquéia/ brônquios	$0,83 \pm 0,07$	10,64%
3 (Estágio + Placa)	2,0 - 3,3	Brônquios secundários	$1,80 \pm 0,09$	23,08%
4 (Estágio + Placa)	1,1 - 2,0	Brônquios terminais	$0,82 \pm 0,08$	10,51%
5 (Estágio + Placa)	0,54 - 1,1	Alvéolos	$0,23 \pm 0,03$	2,95%
6 (Estágio + Placa)	0,25 - 0,54	Alvéolos	$0,14 \pm 0,03$	1,79%
Σ ACI (Emitido)			$6,24 \pm 0,10$	80,00%

A cápsula de HPMC foi preenchida com $10 \pm 1,0$ mg de pó seco de DAS181 ($8,5$ mg $\pm 10\%$ de proteína DAS181).

A fração Σ ACI (Emitido) é a soma de todo o material recuperado da garganta de USP, do cone de indução e dos

5 estágios -1 a 6.

As microesferas de DAS181 foram ainda caracterizadas pela difração a laser, que demonstrou, consistente com os resultados do impacto de cascata, que a maior parte das microesferas produzidas pelo método descrito

10 neste exemplo está dentro de uma faixa de tamanho entre 1 micron e 5 micra. A microscopia eletrônica de varredura (detector FEI Quanta 200 Scanning Electron Microscope, Everhart Thornley (ET)) das microesferas de DAS181 preparadas de acordo com o método descrito neste exemplo revelou que as

15 microesferas estão presentes como aglomerados de centenas e milhares de partículas individuais com um tamanho de aproximadamente 0,5 - 3 micra. Os aglomerados são dissipados, no entanto, facilmente pela turbulência do ar produzida durante o acionamento através do inalador de pó seco (tal

20 como demonstrado pelo Impacto de Cascata Andersen ou por difração a laser). A microscopia luminosa das microesferas dispersas em um tensoativo líquido (por exemplo, Triton X-100

ou Tween 20) ou solvente não-polar (por exemplo, álcool, acetona ou acetonitrilo) que não dissolve as microesferas, confirmou que os agregados são dissipados facilmente como microesferas uniformes individuais.

5 EXEMPLO 11

Preparação das microesferas de DAS181 utilizando sulfatos com exceção de sal de sódio

Os estudos mostraram que em determinados casos, por exemplo, em alguns asmáticos, a presença do sódio nas
10 formulações para a administração pulmonar poderia acarretar um risco de induzir hiper-responsividade das vias aéreas (Agrawal et al., Lung, 183:375-387 (2005)). Este exemplo testou, portanto, sais alternativos, tais como sais de outros metais tais como o potássio, o magnésio e o cálcio.

15 As microesferas de DAS181 foram manufaturadas tal como descrito acima no Exemplo 1. As soluções de coquetel que contêm 12 mg/ml de DAS181 e isopropanol a 5% (em volume/volume) continham como contraíons os sulfatos indicados a 2 mM de concentração, pH 4,5 - 5,0. As
20 microesferas foram formadas ao resfriar as soluções de +25°C para -45°C. Com o congelamento, os componentes voláteis (água e isopropanol) foram removidos através de sublimação, restando o pó seco que contém microesferas.

A distribuição de tamanho de partícula aerodinâmica
25 do pó seco foi avaliada por Impacto de Cascata Andersen, e a quantidade de DAS181 por estágio foi determinada pela medição UV a 226 nm (A226). Os resultados são mostrados abaixo na Tabela 8. Os resultados demonstram que os sais de sulfato com exceção do sal de sódio podem ser utilizados como contraíon
30 para obter as microesferas de DAS181 de uma faixa de tamanho tal que a maior parte é aplicada à garganta, à traquéia e aos brônquios, em uma quantidade que é comparável à quantidade aplicada quando o sulfato de sódio é utilizado como

contraíon.

Tabela 8: Distribuição de tamanho de partícula aerodinâmica das microesferas de DAS181 formuladas com ou sem sódio

	Corte de tamanho correspondente, micron	Deposição esperada nas vias aéreas respiratórias	Porcentagem de DAS181 por estágio			
			Sulfato de sódio	Sulfato de potássio	Sulfato de magnésio	Sulfato de cálcio
Inalador			19,86%	28,58%	21,41%	16,71%
Cápsula			2,07%	2,30%	1,88%	0,00%
Garganta+Cone	> 10	Cavidade oral	11,67%	9,00%	12,91%	16,79%
-1(S+P)	8,6 - 10	Cavidade oral	10,00%	3,43%	7,86%	14,87%
-0(S+P)	6,5 - 8,6	Orofaringe	5,30%	3,08%	4,71%	7,77%
1(S+P)	4,4 - 6,5	Faringe	6,97%	5,86%	6,58%	7,54%
2(S+P)	3,3 - 4,4	Traquéia/brônquios	7,55%	8,24%	6,90%	6,43%
3(S+P)	2,0 - 3,3	Brônquios secundários	19,57%	20,21%	17,01%	12,65%
4(S+P)	1,1 - 2,0	Brônquios terminais	12,39%	14,00%	13,00%	10,39%
5(S+P)	0,54 - 1,1	Alvéolos	2,80%	2,99%	4,31%	4,69%
6(S+P)	0,25 - 0,54	Alvéolos	1,82%	2,31%	3,44%	2,16%

Os pós secos também foram incubados a +37°C ou a +53°C para uma duração tal como indicado na Tabela 9 e testados quanto à atividade de sialidase utilizando o ensaio 4-UM-NANA tal como descrito no Exemplo 1 e aqui incorporado a título de referência. A atividade relativa comparada às microesferas de DAS181 não-lioofilizadas armazenadas a -80°C é mostrada na Tabela 9. Os resultados mostram que a estabilidade das microesferas preparadas utilizando vários sulfatos de metal como contraíons era comparável àquela do sulfato de sódio, com retenção de quase toda ou de toda a atividade por aproximadamente dois meses a 37°C e retenção de quase toda (sulfatos de sódio e de potássio) ou aproximadamente 85% (sulfatos de magnésio e de zinco) a atividade por aproximadamente dez dias a 53°C. Esta experiência demonstra que vários contraíons que não contêm sódio podem produzir microesferas com características desejáveis.

Tabela 9: Atividade de Sialidase de formulações de microesferas de DAS181: estudos de estabilidade acelerada

Temperatura	Percentagem de Atividade Restante			
	37°C		53°C	
Incubação, Dias	42 Dias	69 Dias	11 Dias	39 Dias
2 mM de Sulfato de sódio + 0,268 mM de CaCl ₂	107,14%	105,62%	110,66%	23,66%
2 mM de Sulfato de potássio + 0,268 mM de CaCl ₂	97,37%	104,00%	101,54%	52,76%
2 mM de Sulfato de magnésio + 0,268 mM de CaCl ₂	123,81%	107,29%	85,93%	60,00%
13,34 mM de Cálcio / 2 mM de Sulfato	116,67%	93,20%	87,12%	40,48%

EXEMPLO 12

Estabilidade das microesferas de DAS181

5 A estabilidade da proteína DAS181 nas microesferas foi avaliada ao medir a atividade da sialidase com o passar do tempo utilizando o ensaio de atividade 4-UM-NANA tal como descrito acima no Exemplo 1 e aqui incorporado a título de referência. A produção das microesferas de DAS181 secas foi

10 empreendida em uma solução de coquetel que contém 10 mg/ml de DAS181, 2 mM de sulfato de sódio, e isopropanol a 5% em volume/volume. Para algumas soluções, 0,01% em peso/volume de açúcar (sorbitol, manitol, trehalose ou sacarose) foi adicionado. As microesferas foram formadas ao resfriar as

15 soluções de +25°C para -45°C. Com o congelamento, os componentes voláteis (água e isopropanol) foram removidos através de sublimação, restando os pós secos que contêm microesferas.

20 A. Estabilidade das microesferas de DAS181 sem açúcares

As microesferas de pó seco de DAS181 formuladas sem açúcares foram armazenadas à temperatura ambiente (25°C) em um recipiente ao lado do dessecativo Drierite (Hammond Drierite, Xenia, OH). O pó seco reteve a sua potência

25 original (tal como medido pela atividade da sialidase utilizando 4-MU-NANA de acordo com o Exemplo 1 e aqui incorporado a título de referência; os resultados são

mostrados na Tabela 10) e a distribuição de tamanho de partícula aerodinâmica (tal como medido pelo impacto de cascata Andersen; Tabela 11) por pelo menos oito meses.

Tabela 10: Atividade específica de pó seco de DAS181

Teste	Tempo 0	3 meses	8 meses
Atividade se sialidase com referência ao tempo 0	100%	102,0%	99,9%

5 Tabela 11: Distribuição de tamanho de partícula aerodinâmica de pó seco de DAS181

Componente ACI	Corte de tamanho correspondente, micron	Deposição esperada nas vias aéreas respiratórias	Tempo 0	3 Meses	8 Meses
Garganta + Cone	> 10	Cavidade oral	19,57 ± 2,43	26,00 ± 0,30	18,57 ± 4,14
Estágio -1	8,6 – 10	Cavidade oral	17,87 ± 0,51	12,87 ± 1,56	15,13 ± 2,41
Estágio -0	6,5 – 8,6	Orofaringe	10,27 ± 0,93	7,07 ± 0,32	9,80 ± 1,80
Estágio 1	4,4 – 6,5	Faringe	8,57 ± 0,49	8,80 ± 0,26	7,73 ± 0,57
Estágio 2	3,3 – 4,4	Traquéia/ Brônquios	10,67 ± 0,23	10,70 ± 0,35	9,30 ± 0,82
Estágio 3	2,0 – 3,3	Brônquios secundários	21,10 ± 0,75	21,80 ± 0,52	21,90 ± 0,87
Estágio 4	1,1 – 2,0	Brônquios terminais	10,10 ± 0,75	10,63 ± 0,80	14,50 ± 3,22
Estágio 5	0,54 – 1,1	Alvéolos	1,47 ± 0,23	1,73 ± 0,06	2,37 ± 0,06
Estágio 6	0,25 – 0,54	Alvéolos	0,33 ± 0,06	0,40 ± 0,10	0,73 ± 0,06

10 Tabela 11: A distribuição de partícula aerodinâmica foi avaliada por Impacto de Cascata Andersen e expressa como % de proteína DAS181 total recuperada. As cápsulas foram preenchidas com 10 mg de pó seco de DAS181 e acionadas utilizando o inalador de pó seco Cyclohaler como dispositivo de aplicação. A vazão do ar era de 60 litros por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os desvios médio e padrão são mostrados.

15 B. Estabilidade das microesferas de DAS181 formuladss com açúcares

A atividade de sialidase de DAS181 nas formulações de microesferas de pó seco que contêm açúcares e nas

formulações de microesferas não-liofilizadas armazenadas a -80°C foi medida utilizando o substrato fluorescente 4-MU-NANA tal como descrito no Exemplo 1 e aqui incorporado a título de referência. As formulações de pó seco que não contêm nenhum açúcar ou vários açúcares tal como indicado abaixo na Tabela 12 foram armazenadas a +42°C por quatro semanas (degradação forçada). Os resultados são mostrados na Tabela 12. Em relação às formulações não-liofilizadas armazenadas a -80°C, a formulação que não contém nenhum açúcar reteve quase 80% de sua atividade. A adição de vários açúcares aumenta a estabilidade de modo que aproximadamente 88-98% da atividade são retidos, dependendo do açúcar.

Tabela 12

Açúcar	Percentagem de Atividade de Sialidase Restante após quatro semanas a 42°C
Nenhum açúcar	79,82
Sorbitol	91,23
Manitol	89,47
Trehalose	97,37
Sacarose	88,60

Uma vez que modificações serão aparentes aos elementos versados nesta técnica, pretende-se que a presente invenção seja limitada somente pelo âmbito das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO À BASE DE PROTEÍNA, caracterizado pelo fato de compreender:

- 5 a) a adição de um contraíon a uma solução que contém a proteína em um solvente aquoso;
- b) a adição de um solvente orgânico à solução; e
- c) o resfriamento gradual da solução até uma temperatura abaixo de aproximadamente 25°C, por meio do que uma composição que contém micropartículas que compreendem a
- 10 proteína é obtida, em que as etapas a), b) e c) são executadas simultânea, sequencial, intermitentemente, ou em qualquer ordem.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas a) e b) são

15 executadas simultânea ou sequencialmente em qualquer ordem, seguidas pela etapa c).

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que etapas a), b) e c) são executadas sequencialmente na ordem: a), a seguir b), e a

20 seguir c).

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o solvente orgânico é miscível ou parcialmente miscível com o solvente aquoso.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1,

25 caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente, após a etapa c), a separação das micropartículas da solução para remover os componentes com exceção das micropartículas.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a composição consiste

30 essencialmente em micropartículas que compreendem a proteína.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a separação é executada através da sedimentação ou da filtração.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a separação é executada através de secagem por congelamento.

5 9. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o solvente orgânico é selecionado entre álcoois alifáticos, álcoois aromáticos, clorofórmio, cloreto de dimetila, álcoois de açúcar poliídricos, hidrocarbonetos aromáticos, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, dioxanos, alcanos, alcenos, dienos
10 conjugados, diclorometano, acetonitrilo, acetato de etila, polióis, poliimidas, poliésteres, polialdeídos, e as misturas destes.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o solvente orgânico é um
15 álcool alifático ou um álcool aromático.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o solvente orgânico é um álcool alifático.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11,
20 caracterizado pelo fato de que o álcool alifático é o isopropanol.

13. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o contraíon é selecionado entre de um composto aniônico, um
25 composto catiônico e um composto dipolar.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o contraíon é um composto aniônico.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 14,
30 caracterizado pelo fato de que o composto aniônico é selecionado entre glicina, citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de zinco, sulfato de magnésio, sulfato de potássio e sulfato de cálcio.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o composto aniônico é o sulfato de sódio.

5 17. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que as micropartículas são obtidas por meio de precipitação, da separação de fases ou da formação de colóide.

10 18. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o pH da solução é igual ou abaixo do pH da proteína.

19. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17 ou a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o pH da solução varia de aproximadamente 4,0 ou 4,0 a aproximadamente 9,0 ou 9,0.

15 20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17 ou da reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o pH da solução varia de aproximadamente 4,5 ou 4,5 a aproximadamente 8,0 ou 8,0.

20 21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17 ou da reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o pH da solução varia de aproximadamente 4,5 ou 4,5 a aproximadamente 6,5 ou 6,5.

25 22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17 ou da reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o pH da solução varia de aproximadamente 4,5 ou 4,5 a aproximadamente 5,5 ou 5,5.

30 23. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 12, 15, 16 ou 22, caracterizado pelo fato de que a proteína é selecionada entre sialidases, proteínas de fusão da sialidase, proteases, inibidores de protease, citocinas, insulina, hormônio humano do crescimento, calcitonina, DNase humana recombinante, interferons e hormônio da paratireóide.

24. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a proteína é um inibidor da protease.

5 25. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o inibidor de protease é o inibidor de protease humana 8 (PI8).

26. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a proteína é uma proteína de fusão da sialidase.

10 27. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão da sialidase contém um domínio catalítico de um sialidase e um domínio de ancoragem, em que o domínio catalítico da sialidase é a única parte da sialidase na proteína de fusão
15 da sialidase.

28. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 26 ou da reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a sialidase é uma sialidase de *Actinomyces viscosus*, uma sialidase de *Clostridium perfringens*, uma sialidase de *Arthrobacter ureafaciens*, uma sialidase de *Micromonospora viridifaciens*,
20 uma sialidase Neu2 humana ou uma sialidase Neu4 humana.

29. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a sialidase é uma sialidase de *Actinomyces viscosus*.

25 30. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos do domínio catalítico contém a sequência dos resíduos de aminoácidos que começam em qualquer um dos aminoácidos do aminoácido 270 ao aminoácido 290 e que terminam em qualquer
30 um dos aminoácidos do aminoácido 665 ao aminoácido 901 da sequência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°. : 1.

31. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a sequência do domínio

catalítico da sialidase contém a seqüência de resíduos de aminoácidos indicada na ID SEQ N°. : 2.

32. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a seqüência do domínio catalítico compreende a seqüência dos resíduos de aminoácidos que começam no aminoácido 274 e que terminam no aminoácido 681 da seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°. : 1.

33. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a seqüência do domínio catalítico compreende a seqüência dos resíduos de aminoácidos que começam no aminoácido 274 e que terminam no aminoácido 666 da seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°. : 1.

34. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a seqüência do domínio catalítico compreende a seqüência de aminoácidos que começa no aminoácido 290 e que terminam no aminoácido 681 da seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°. : 1.

35. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 e 29 a 34, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão contém um domínio de ancoragem que é um domínio de ligação de glicosaminoglicano (GAG).

36. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação de GAG é selecionado entre o domínio de ligação de GAG do fator de plaquetas humanas 4, o domínio de ligação de GAG de interleucina humana 8, o domínio de ligação de GAG de antitrombina humana III, o domínio de ligação de GAG de apoproteína humana E, o domínio de ligação de GAG de proteína migratória angio-associada humana e o domínio de ligação de GAG de anfiregulina humana.

37. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos do domínio de ligação de GAG contém a seqüência de resíduos de

aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 3, ID SEQ N°.: 4, ID SEQ N°.: 5, ID SEQ N°.: 6, ID.NO:7 SEQ ou ID SEQ N°.: 8.

38. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos do domínio de ligação de GAG contém a seqüência de resíduos de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 8.

39. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos da proteína de fusão de sialidase contém a seqüência de resíduos de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 9.

40. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos da proteína de fusão de sialidase contém a seqüência de resíduos de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 10.

41. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos da proteína de fusão de sialidase contém a seqüência de resíduos de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 11 ou na ID SEQ N°.: 12.

42. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos da proteína de fusão de sialidase contém a seqüência de resíduos de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 13 ou na ID SEQ N°.: 14.

43. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos da proteína de fusão de sialidase contém a seqüência de resíduos de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 17.

44. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 26, 27, 29 a 34 e 36 a 44, caracterizado pelo fato de que a composição de micropartículas resultante também compreende agentes de revestimento resistentes a ácidos, agentes de revestimento

resistentes à protease, agentes de revestimento entéricos, agentes aumentadores de volume, excipientes, ingredientes inativos, intensificadores da estabilidade, modificadores de sabor e/ou odor ou agentes mascaradores, vitaminas, agentes terapêuticos, antioxidantes, immuno-moduladores, modificadores do transporte de trans-membrana, agentes anti-endurecimento, quitosanas ou intensificadores de fluidez.

45. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 26, 27, 29 a 34 e 36 a 44, caracterizado pelo fato de que a quantidade de proteína nas micropartículas em relação à quantidade total de proteína na solução da etapa a) é aproximadamente 80% ou 80% a mais de aproximadamente 99% ou 99%.

46. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 26, 27, 29 a 34 e 36 a 44, caracterizado pelo fato de que a temperatura fica compreendida entre aproximadamente 4°C aproximadamente e -45°C.

47. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que a temperatura fica compreendida entre aproximadamente 2°C aproximadamente e -20°C.

48. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a temperatura fica compreendida entre aproximadamente 2°C aproximadamente e -15°C.

49. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que a temperatura fica compreendida entre aproximadamente 0°C ou 0°C e aproximadamente -2°C ou -2°C e aproximadamente -15°C ou -15°C e aproximadamente -20°C ou -20°C.

50. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 26, 27, 29 a 34, 36 a 44 e 46 a 49,

caracterizado pelo fato de que a composição à base de proteína resultante tem uma vida útil de aproximadamente uma semana a aproximadamente um mês, de aproximadamente um mês a aproximadamente seis meses, de aproximadamente seis meses a aproximadamente um ano, de aproximadamente um ano a aproximadamente dois anos, ou de aproximadamente dois anos a aproximadamente cinco anos, a uma temperatura de aproximadamente 55°C, 50°C, 45°C, 44°C, 42°C, 40°C, 39°C, 38°C, 37°C ou menos.

10 51. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a solução e/ou a composição resultante também compreende um agente ativo.

15 52. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o agente ativo é selecionado entre antidiabéticos, anticonvulsionantes, analgésicos, anti-mnal de Parkinson, anti-inflamatórios, antagonistas de cálcio, anestésicos, microbicidas, antimaláricos, antiparasíticos, antihipertensivos, antihistaminínicos, 20 antipiréticos, agonistas alfa-adrenérgicos, alfa-bloqueadores, biocidas, bactericidas, dilatadores dos brônquios, drogas bloqueadoras beta-adrenérgicas, contraceptivos, drogas cardiovasculares, inibidores de canais de cálcio, antidepressivos, agentes de diagnóstico, 25 diuréticos, eletrólitos, enzimas, hipnóticos, hormônios, hipoglicêmicos, hiperglicêmicos, constritores musculares, relaxantes musculares, neoplásticos, glicoproteínas, nucleoproteínas, lipoproteínas, oftálmicos, energizantes psíquicos, sedativos, esteróides, simpatomiméticos, 30 parasimpatomiméticos, tranquilizantes, drogas do trato urinário, vacinas, drogas vaginais, vitaminas, sais minerais, drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, enzimas de conversão de angiotensina, polinucleotídeos, polipeptídeos e

polissacarídeos.

53. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o agente ativo é selecionado entre antidiabéticos, enzimas, hormônios, vitaminas, sais
5 minerais, e suplementos nutritivos.

54. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 26, 27, 29 a 34, 36 a 44, 46 a 49, 52 e 53, caracterizado pelo fato de que o teor de umidade das micropartículas é ajustado, por meio do que pelo menos
10 aproximadamente 90% da atividade da proteína são retidos após uma armazenagem por aproximadamente seis meses a aproximadamente um ano a uma temperatura de aproximadamente 25°C.

55. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 26, 27, 29 a 34, 36 a 44, 46 a 49, 52 e 53, caracterizado pelo fato de que o teor de umidade das micropartículas é ajustado, por meio do que pelo menos
15 aproximadamente 90% das micropartículas não são agregados após a armazenagem por aproximadamente seis meses a aproximadamente um ano a uma temperatura de aproximadamente 25°C.
20

56. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

a proteína é uma proteína de fusão que contém um
25 domínio catalítico da sialidase e um domínio de ancoragem, em que o domínio catalítico da sialidase é a única parte da sialidase na proteína de fusão;

o solvente orgânico é adicionado em uma quantidade de aproximadamente 5% ou 5% a aproximadamente 20% ou 20% em
30 volume/volume;

o contraíon é adicionado em uma quantidade de aproximadamente 1 mM ou 1 mM a aproximadamente 5 mM ou 5 mM;
e

o pH da solução é ajustado em aproximadamente 4,5 ou 4,5 a aproximadamente 5,5 ou 5,5.

57. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que o domínio catalítico da sialidase é de *Actinomyces viscosus* e o domínio de ancoragem é o domínio de ligação de GAG de anfiregulina humana.

58. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 56 ou a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o pH é de aproximadamente 5,0.

10 59. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 56 ou da reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o contraíon é selecionado entre glicina, citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de zinco, sulfato de magnésio, sulfato de potássio e sulfato de cálcio.

15 60. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que o contraíon é o sulfato de sódio.

61. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 56, da reivindicação 57 ou a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que o solvente orgânico é o isopropanol.

20 62. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 56 ou da reivindicação 57, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente a separação das micropartículas da solução para remover os componentes com exceção das micropartículas.

25 63. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a composição resultante consiste essencialmente em micropartículas que compreendem a proteína.

64. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a separação é através da sedimentação ou da filtração.

65. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a separação é através da

secagem por congelamento.

66. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o teor de umidade das micropartículas varia de aproximadamente 6% a aproximadamente 12%.

67. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que o teor de umidade das micropartículas varia de aproximadamente 7% a aproximadamente 10,5%.

68. COMPOSIÇÃO, caracterizada pelo fato de compreender micropartículas de um sialidase ou de uma proteína de fusão da sialidase.

69. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 68, caracterizada pelo fato de que a proteína é uma proteína de fusão da sialidase e a proteína de fusão da sialidase compreende um domínio catalítico de uma sialidase e um domínio de ancoragem.

70. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 68 ou a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de que a sialidase é uma sialidase de *Actinomyces viscosus*, uma sialidase de *Clostridium perfringens*, uma sialidase de *Arthrobacter ureafaciens*, uma sialidase de *Micromonospora viridifaciens*, uma sialidase Neu2 humana, ou um sialidase Neu4 humana.

71. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 70, caracterizada pelo fato de que a sialidase é uma sialidase de *Actinomyces viscosus*.

72. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 71, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos do domínio catalítico compreende a sequência de aminoácidos que começa em qualquer um dos resíduos de aminoácidos do aminoácido 270 ao aminoácido 290 e que termina em qualquer um dos resíduos de aminoácidos do aminoácido 665 ao aminoácido

901 da seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 1.

73. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que a seqüência do domínio catalítico de sialidase compreende a seqüência de aminoácidos
5 indicada na ID SEQ N°.: 2.

74. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que a seqüência do domínio catalítico compreende a seqüência de aminoácidos que começa no aminoácido 274 e que termina no aminoácido 681 da
10 seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 1.

75. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que a seqüência do domínio catalítico compreende a seqüência de aminoácidos que começa no aminoácido 290 e que termina no aminoácido 666 da
15 seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 1.

76. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que a seqüência do domínio catalítico compreende a seqüência de aminoácidos que começa no aminoácido 290 e que termina no aminoácido 681 da
20 seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 1.

77. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 76, caracterizada pelo fato de que o domínio de ancoragem é um domínio de ligação de glicosaminoglicano (GAG).

25 78. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 77, caracterizada pelo fato de que o domínio de ligação de GAG é selecionado entre o domínio de ligação de GAG do fator de plaquetas humanas 4, o domínio de ligação de GAG de interleucina humano 8, o domínio de ligação de GAG de
30 antitrombina humana III, o domínio de ligação de GAG de apoproteína humana E, o domínio de ligação de GAG da proteína migratória anglo-associada humana e o domínio de ligação de GAG de anfiregulina humano.

79. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 78, caracterizada pelo fato de que a seqüência de aminoácidos do domínio de ligação de GAG compreende a seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 3, ID SEQ N°.: 4, ID SEQ N°.: 5, ID SEQ N°.: 6, ID SEQ N°.: 7 ou ID SEQ N°.: 8.

80. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 79, caracterizada pelo fato de que a seqüência de aminoácidos do domínio de ligação de GAG compreende a seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 8.

81. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de que a seqüência de aminoácidos da proteína de fusão de sialidase compreende a seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 9.

82. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de que a seqüência de aminoácidos da proteína de fusão de sialidase compreende a seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 10.

83. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de que a seqüência de aminoácidos da proteína de fusão de sialidase compreende a seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 11.

84. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de que a seqüência de aminoácidos da proteína de fusão de sialidase compreende a seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 12.

85. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de que a seqüência de aminoácidos da proteína de fusão de sialidase compreende a seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 13 ou em ID SEQ N°.: 14.

86. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de que a seqüência de aminoácidos da proteína de fusão de sialidase compreende a seqüência de aminoácidos indicada na ID SEQ N°.: 17.

87. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 86, caracterizada pelo fato de que a quantidade de proteína nas micropartículas varia de aproximadamente 60% a mais de aproximadamente 99% em peso/peso.

88. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que a quantidade de proteína nas micropartículas varia de aproximadamente 65% a aproximadamente 90% em peso/peso.

89. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 88, caracterizada pelo fato de que a quantidade de proteína nas micropartículas varia de aproximadamente 70% a aproximadamente 85%, 86%, 87%, 88%, 89% ou 90% em peso/peso.

90. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 88, caracterizada pelo fato de que a quantidade de proteína nas micropartículas varia de aproximadamente 90% a aproximadamente 99% em peso/peso.

91. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 90, caracterizada pelo fato de ter uma vida útil de aproximadamente uma semana a aproximadamente um mês, de aproximadamente um mês a aproximadamente seis meses, de aproximadamente seis meses a aproximadamente um ano, de aproximadamente um ano a aproximadamente dois anos, ou de aproximadamente dois anos a aproximadamente cinco anos, a uma temperatura de aproximadamente 55°C, 50°C, 45°C, 44°C, 42°C, 40°C, 39°C, 38°C, 37°C ou menos.

92. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 91, caracterizada pelo fato de que as micropartículas compreendem adicionalmente agentes de revestimento resistentes a ácidos, agentes de revestimento resistentes à protease, agentes de revestimento entéricos, agentes aumentadores de volume, excipientes, ingredientes inativos, intensificadores da estabilidade, modificadores de

sabor e/ou odor ou agentes mascaradores, vitaminas, agentes terapêuticos, anti-oxidantes, imuno-moduladores, modificadores do transporte de trans-membrane, agentes anti-endurecimento, quitosanas ou intensificadores da fluidez.

5 93. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 92, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente um agente ativo.

 94. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 93, caracterizada pelo fato de que o agente ativo é selecionado
10 que entre antidiabéticos, anticonvulsionantes, analgésicos, anti-mal de Parkinson, anti-inflamatórios, antagonistas de cálcio, anestésicos, microbicidas, antimaláricos, antiparasíticos, antihipertensivos, antihistamínicos, antipiréticos, agonistas alfa-adrenérgicos, alfa-
15 bloqueadores, biocidas, bactericidas, dilatadores dos brônquios, drogas bloqueadoras beta-adrenérgicas, contraceptivos, drogas cardiovasculares, inibidores de canais de cálcio, antidepressivos, agentes de diagnóstico, diuréticos, eletrólitos, enzimas, hipnóticos, hormônios,
20 hipoglicêmicos, hiperglicêmicos, constritores musculares relaxantes musculares, neoplásticos, glicoproteínas, nucleoproteínas, lipoproteínas, oftálmicos, energizantes psíquicos, sedativos, esteroides, simpatomiméticos, parasimpatomiméticos, tranquilizantes, drogas do trato
25 urinário, vacinas, drogas vaginais, vitaminas, sais minerais, drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, enzimas de conversão de angiotensina, polinucleotídeos, polipeptídeos e polissacarídeos.

 95. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 93,
30 caracterizada pelo fato de que o agente ativo é selecionado entre antidiabéticos, enzimas, hormônios, vitaminas, sais minerais, e suplementos nutritivos.

 96. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 68 a 95, caracterizada pelo fato de que o teor de umidade das micropartículas é ajustado, por meio do que pelo menos aproximadamente 90% da atividade da proteína são retidos após uma armazenagem por aproximadamente seis meses a
5 aproximadamente um ano a uma temperatura de aproximadamente 25°C.

97. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 96, caracterizada pelo fato de que as micropartículas compreendem adicionalmente um contraíon.

10 98. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 97, caracterizada pelo fato de que o contraíon é um ânion, um cátion, ou um íon dipolar.

99. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 97, caracterizada pelo fato de que o contraíon é selecionado
15 entre glicina, citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de zinco, sulfato de magnésio, sulfato de potássio e sulfato de cálcio.

100. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 99, caracterizada pelo fato de que o contraíon é o sulfato de
20 sódio.

101. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 100, caracterizada pelo fato de que a quantidade de contraíon nas micropartículas varia de aproximadamente 0,5% ou 0,5% a aproximadamente 5% ou 5% em
25 peso/peso.

102. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 101, caracterizada pelo fato de que a quantidade de contraíon nas micropartículas varia de aproximadamente 0,5% ou 0,5% a aproximadamente 2% ou 2% em peso/peso.

30 103. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 102, caracterizada pelo fato de que a quantidade de contraíon nas micropartículas varia de aproximadamente 1% ou 1% a aproximadamente 2% ou 2% em peso/peso.

104. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68-103, caracterizada pelo fato de que o teor de umidade das micropartículas varia de aproximadamente 6% ou 6% a aproximadamente 12% ou 12%.

5 105. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 104, caracterizada pelo fato de que o teor de umidade das micropartículas varia de aproximadamente 7% ou 7% a aproximadamente 10,5% ou 10,5%.

10 106. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 105, caracterizada pelo fato de servir para a administração oral.

107. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 106, caracterizada pelo fato de servir para a ingestão.

15 108. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 105, caracterizada pelo fato de servir para a administração intravenosa, intranasal, parenteral, pulmonar, subcutânea, oftálmica ou intramuscular.

20 109. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 105, caracterizada pelo fato de servir para a inalação.

110. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 110, caracterizada pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 0,001 μm ou 0,001 μm a aproximadamente 50 μm ou 50 μm .

25 111. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 110, caracterizada pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 0,3 μm ou 0,3 μm a aproximadamente 30 μm ou 30 μm .

30 112. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 111, caracterizada pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 0,5 μm ou 0,5 μm a aproximadamente 10 μm ou 10 μm .

113. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 112,

caracterizada pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 0,5 μm ou 0,5 μm a aproximadamente 5,0 μm ou 5,0 μm .

5 114. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 113, caracterizada pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 1,0 μm ou 1,0 μm a aproximadamente 5,0 μm ou 5,0 μm .

10 115. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 114, caracterizada pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 1,0 μm a aproximadamente 2,0, 3,0, 4,0 ou 5,0 μm .

15 116. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 56 ou 57, caracterizada pelo fato de que a quantidade de solvente orgânico adicionada varia de aproximadamente 0,1% ou 0,1% a aproximadamente 50% ou 50% em volume/volume.

20 117. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 116, caracterizada pelo fato de que a quantidade de solvente orgânico adicionada varia de aproximadamente 1% ou 1% a aproximadamente 30% ou 30% em volume/volume.

118. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 117, caracterizada pelo fato de que a quantidade de solvente orgânico adicionada varia de aproximadamente 5% ou 5% a aproximadamente 30% ou 30% em volume/volume.

25 119. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 118, caracterizada pelo fato de que a quantidade de solvente orgânico adicionada varia de aproximadamente 10% ou 10% a aproximadamente 30% ou 30% em volume/volume.

30 120. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 119, caracterizada pelo fato de que a quantidade de solvente orgânico adicionada varia de aproximadamente 15% ou 15% a aproximadamente 20% ou 20% em volume/volume.

121. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 8, 56 ou 57, caracterizada pelo fato de que a concentração do contraíon adicionada à solução varia de aproximadamente 0,1 mM ou 0,1 mM a aproximadamente 100 mM ou 100 mM.

5 122. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 121, caracterizada pelo fato de que a concentração do contraíon adicionada à solução varia de aproximadamente 0,2 mM ou 0,2 mM a aproximadamente 50 mM ou 50 mM.

10 123. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 122, caracterizada pelo fato de que a concentração do contraíon adicionada à solução varia de aproximadamente 0,3 mM ou 0,3 mM a aproximadamente 30 mM ou 30 mM.

15 124. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 123, caracterizada pelo fato de que a concentração do contraíon adicionada à solução varia de aproximadamente 0,5 mM ou 0,5 mM a aproximadamente 20 mM ou 20 mM.

20 125. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 124, caracterizada pelo fato de que a concentração do contraíon adicionada à solução varia de aproximadamente 1 mM ou 1 mM a aproximadamente 10 mM ou 10 mM.

126. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 125, caracterizada pelo fato de que a concentração do contraíon adicionada à solução é de aproximadamente 5 mM ou 5 mM.

25 127. ARTIGO DE MANUFATURA, caracterizado pelo fato de compreender a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 115, um material de acondicionamento para a composição, e uma etiqueta que indica que a composição é para uma indicação terapêutica.

30 128. ARTIGO, de acordo com a reivindicação 127, caracterizado pelo fato de que a indicação terapêutica é a influenza.

129. ARTIGO, de acordo com a reivindicação 127 ou a reivindicação 128, caracterizado pelo fato de compreender

adicionalmente um inalador para a administração pulmonar da composição.

130. ARTIGO, de acordo com a reivindicação 129, caracterizado pelo fato de que o inalador é um inalador de pó seco, um inalador de dose medida ou um dispositivo de aplicação eletrostática.

131. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 26, 27, 29 a 34, 36 a 44, 46 a 49, 52 e 53, caracterizado pelo fato de que o resfriamento gradual se dá a uma taxa de aproximadamente 0,0 °C/min ou 0,0 °C/min a aproximadamente 20°C/min ou 20°C/min.

132. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 131, caracterizado pelo fato de que o resfriamento gradual se dá a uma taxa de aproximadamente 0,05°C/min ou aproximadamente 0,05°C/min a aproximadamente 10°C/min ou aproximadamente 15°C/min.

133. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 132, caracterizado pelo fato de que o resfriamento gradual se dá a uma taxa de aproximadamente 0,2°C/min a aproximadamente ou 5°C/min.

134. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 133, caracterizado pelo fato de que o resfriamento gradual se dá a uma taxa de aproximadamente ou 0,5°C/min a aproximadamente ou 2°C/min.

135. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 134, caracterizado pelo fato de que o resfriamento gradual se dá a uma taxa de aproximadamente 1°C/min.

136. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, 26, 27, 29 a 34, 36 a 44, 46 a 49, 52 e 53, caracterizado pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 0,001 µm ou 0,001 µm a aproximadamente 50 µm ou 50 µm.

137. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 136,

caracterizado pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 0,3 μm ou 0,3 μm a aproximadamente 30 μm ou 30 μm .

5 138. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 137, caracterizado pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 0,5 μm ou 0,5 μm a aproximadamente 10 μm ou 10 μm .

10 139. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 138, caracterizado pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 0,5 μm ou 0,5 μm a aproximadamente 5,0 μm ou 5,0 μm .

15 140. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 139, caracterizado pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 1,0 μm ou 1,0 μm a aproximadamente 5,0 μm ou 5,0 μm .

141. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 140, caracterizado pelo fato de que o tamanho das micropartículas varia de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 2,0, 3,0, 4,0 ou 5,0 μm .

RESUMO

MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO À BASE DE PROTEÍNA, COMPOSIÇÃO E ARTIGO DE MANUFATURA

5 As microesferas são produzidas ao entrar em contato com uma solução aquosa de uma proteína ou de outra macromolécula com um solvente orgânico e um contraíon e resfriar a solução. As microesferas são úteis para preparar produtos farmacêuticos de dimensões definidas.