

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

(21) **PI 0712142-3 A2**



(22) Data de Depósito: 11/06/2007
(43) Data da Publicação: 10/01/2012
(RPI 2140)

(51) *Int.Cl.:*

A61K 9/00
A61K 9/16
A61K 9/10
A61K 9/19
A61K 38/27
A61K 38/21
A61K 38/28

(54) **Título:** FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA A LIBERAÇÃO PROLONGADA DE PRINCÍPIO(S) ATIVO(S), BEM COM SUAS APLICAÇÕES, ESPECIALMENTE APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

(30) **Prioridade Unionista:** 09/06/2006 FR 06/05152

(73) **Titular(es):** Flamel Technologies

(72) **Inventor(es):** Alain Constancis, Cécile Bonnet Gonnet, David Chognot, Olivier Soula

(74) **Procurador(es):** Montauray Pimenta, Machado & Lioce S/C Ltda

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2007055720 de 11/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/141344de 13/12/2007

(57) **Resumo:** FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA A LIBERAÇÃO PROLONGADA E PRINCÍPIO (S) ATIVO (S), BEM SUAS APLICAÇÕES, ESPECIALMENTE APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS. A Presente invenção refere-se a formulação farmacêuticas novas com base em suspensões coloidais aquosas para a liberação prolongada de princípio (s), ativo (s) - PA- particularmente proteína (s) e peptídeo (s), bem como as aplicações, especialmente aplicações terapêuticas, dessas formulação compreende uma suspensão coloidal aquosa de baixa viscosidade baseada em partículas micrométricas de um polímero PO solúvel em água, biodegradável, anfifílico contendo grupo hidrofóbicos (GH) - alfa-tocoferol - e grupos hidrofílicos ionizáveis (GI) - glu - que são pelo menos parcialmente ionizados, as partículas sendo capazes de se associar espontânea e não covalentemente com PA, em pH = 7,0, sob condições isotônicas, e tendo um tamanho entre 0,5 e 100 µm. Essa suspensão contém íons multivalentes (MG⁺⁺) de polaridade oposta àquela do grupo Gi do PO, a razão r, definida pela fórmula (A) $r = n \times \frac{[IM]}{[GI]}$ (A) onde - n é a valência dos íons multivalentes, - [MI] é a concentração molar de íons multivalentes, - [GI] é a concentração molar de grupos ionizáveis GI, estando entre 0,3 e 10.

$$r = n \times \frac{[IM]}{[GI]}, \text{ où : (A)}$$

*

**FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA A LIBERAÇÃO PROLONGADA DE
PRINCÍPIO(S) ATIVO(S), BEM COMO SUAS APLICAÇÕES,
ESPECIALMENTE APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**

A presente invenção refere-se a formulações
5 farmacêuticas baseadas em suspensões coloidais aquosas para
a liberação prolongada de um ou mais princípios ativos PA,
particularmente os princípios ativos de peptídeo e
proteína, e às aplicações, especialmente aplicações
terapêuticas dessas formulações.

10 Essas formulações farmacêuticas se aplicam a
terapêutica tanto humana como veterinária.

No campo da liberação prolongada de PA
farmacêutico, especialmente proteínas terapêuticas, há
necessidade em muitos casos de assegurar tanto quanto
15 possível que a concentração de peptídeo ou proteína de
plasma do paciente esteja próxima ao valor observado no
indivíduo saudável.

Esse objetivo é comprometido pela vida curta de
proteínas no plasma, o que torna necessário injetar a
20 proteína terapêutica repetidamente. A concentração de
plasma de proteína terapêutica, então, tem um perfil
serrado (sawtooth) caracterizado por picos de concentração
elevada e mínima de concentração muito baixa. Os picos de
concentração, que são bem maiores do que a concentração
25 basal no indivíduo saudável; têm efeitos prejudiciais muito
acentuados devido à elevada toxicidade de proteínas
terapêuticas como a interleucina IL2. Além disso, as
mínimas de concentração estão abaixo da concentração que é
necessária para ter um efeito terapêutico, assim o paciente
30 recebe cobertura terapêutica ruim e sofre consequências
graves a longo prazo.

Além disso, para assegurar que a concentração de
proteína terapêutica no plasma do paciente esteja próxima

do valor ideal para esse tratamento, a formulação farmacêutica em questão tem de permitir a liberação prolongada da proteína terapêutica de modo a limitar as variações em concentração de plasma com o passar do tempo.

5 Adicionalmente, essa formulação ativa deve satisfazer preferivelmente as seguintes especificações já familiares àqueles versados na técnica:

1 1 - liberação prolongada de uma proteína terapêutica não desnaturada e ativa, por exemplo, proteína
10 sintética ou humana, de modo que a concentração de plasma seja mantida no nível terapêutico;

2 2 - viscosidade de injeção suficientemente baixa para ser facilmente injetável;

3 3 - forma biocompatível e biodegradável;

15 4 - forma que não apresenta nem toxicidade nem imunogenicidade;

5 5 - forma tendo uma excelente tolerância local.

Em uma tentativa para atingir esses objetivos, uma das melhores abordagens propostas na técnica anterior
20 foi desenvolver formas para a liberação prolongada de proteína(s) terapêutica(s) que consistem em suspensões líquidas de baixa viscosidade de nanopartículas carregadas com proteínas terapêuticas. Essas suspensões facilitaram a administração de proteínas terapêuticas nativas.

25 Desse modo, Flamel Technologies propôs um método no qual a proteína terapêutica é associada às nanopartículas de um copoliaminoácido compreendendo grupos hidrofóbicos e grupos hidrofílicos.

30 A patente US-B-5.904.936 descreve partículas submicrônicas (NPV), com um tamanho médio entre 0,01 e 0,5 μm , e partículas micrométricas (MPV), com um tamanho médio entre 0,5 e 20 μm , de um copolímero de poliaminoácido anfifílico compreendendo pelo menos dois tipos de

aminoácido, um sendo neutro e hidrofóbico e o outro sendo ionizável. Proteínas como insulina são espontaneamente adsorvidas sobre essas partículas em solução aquosa. O copolímero de poliaminoácido é, por exemplo, um copolímero em bloco de poli(L-leucina-bloco-sódio L-glutamato). A patente descreve a agregação de NPV em MPV por adição de sais monocatiônicos (sulfato de amônio) ou sais policatiônicos (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Al^{2+} , Al^{3+} ou Cu^{2+}), um ácido (HCl) ou polímeros catiônicos (polilisina) a uma suspensão coloidal de poli-Leu/Glu.

O pedido de patente WO-A-2005/033181 revela homopoliaminoácidos lineares, anfifílicos, aniônicos que compreendem unidades aspárticas ou unidades glutâmicas e cujas extremidades portam grupos hidrofóbicos contendo 8 a 30 átomos de carbono. Em particular, os homopoliaminoácidos telequéllicos "hidrofobicamente modificados" são, por exemplo, um poli[GluONa] com extremidades PheOC18/C18 ou um poli[GluONa] com extremidades PheCO18/alfa-tocoferol. Em água, esses homopoliaminoácidos telequéllicos "hidrofobicamente modificados" formam espontaneamente uma suspensão coloidal de nanopartículas que são facilmente capazes de se associar, em suspensão aquosa em pH 7,4, com pelo menos uma proteína ativa (insulina).

O tempo de liberação *in vivo* da(s) proteína(s) ativa(s) (por exemplo, insulina) "vetorizada" pelas suspensões de acordo com US-B-5.904.936 e WO-A-2005/033181 poderia ser aumentado de forma rentável.

Um aumento no tempo de liberação foi parcialmente obtido pelas formas farmacêuticas descritas no pedido PCT WO-A-05/051416. No pedido de patente, uma suspensão coloidal hidrofobicamente modificada de nanopartículas (0,001-0,5 μm) de poli(sódio L-glutamato) é injetada em uma concentração tal que, após injeção subcutânea, um gel se

forma no local no paciente em contato com a albumina de soro endógena. A proteína é, então, liberada lentamente, tipicamente durante um período de uma semana. Entretanto, quando a concentração de proteína terapêutica a ser

5 administrada é relativamente elevada, como é o caso de hormônio de crescimento humano, por exemplo, o tempo de liberação é limitado a somente alguns dias.

Qualquer que possa ser o caso, nada na técnica anterior referente a colóides de nanopartículas ou

10 micropartículas de poliaminoácidos hidrofobicamente modificados revela uma formulação que torna possível:

(I) aumentar o tempo de liberação da proteína ativa após injeção parenteral, por exemplo, injeção subcutânea, particularmente quando a concentração de

15 proteína é elevada,

(II) e/ou reduzir o pico de concentração de plasma da proteína ativa após injeção da formulação contendo a mesma.

Sob essas condições, um dos objetivos da presente

20 invenção é, portanto, propor uma formulação farmacêutica para a liberação prolongada de PA que supere as deficiências da técnica anterior e, em particular, torne possível, após injeção parenteral (por exemplo, subcutânea), obter um tempo de liberação *in vivo* prolongado

25 para o PA não desnaturado (por exemplo, peptídeos e proteínas terapêuticas e moléculas pequenas), por exemplo, proteínas humanas ou sintéticas.

Outro objetivo da invenção é propor uma formulação farmacêutica que torne possível, após injeção

30 parenteral (por exemplo, subcutânea), obter um tempo de liberação *in vivo* prolongado para peptídeos e proteínas terapêuticas altamente concentradas, por exemplo, aquelas contendo vários mg/ml.

Outro objetivo da invenção é propor uma formulação farmacêutica para a liberação prolongada de PA *in vivo* que seja estável em armazenagem em termos tanto físico-químicos como biológicos.

5 Outro objetivo da invenção é propor uma formulação farmacêutica para a liberação prolongada de PA *in vivo* que tenha pelo menos uma das seguintes propriedades: biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, boa tolerância local.

10 Outro objetivo da invenção é propor uma formulação farmacêutica para a liberação prolongada lenta de PA *in vivo*, a formulação compreendendo partículas micrométricas de polímero PO que são auto-associadas ou auto-associáveis com pelo menos um PA, o PO sendo um
15 polímero biodegradável solúvel em água que porta grupos hidrofóbicos (GH) e grupos ionizáveis (GI), e formando espontaneamente uma suspensão de nanopartículas coloidais em água.

 Outro objetivo da invenção é propor uma
20 formulação farmacêutica compreendendo partículas micrométricas do polímero PO *vide supra* que, após injeção subcutânea, é capaz de liberar uma proteína ou peptídeo terapêutico durante um tempo mais longo do que o tempo de liberação obtido após administração da mesma proteína
25 misturada em um meio aquoso do PA com a suspensão coloidal do polímero PO.

 Outro objetivo da invenção é propor uma formulação farmacêutica para a liberação prolongada lenta de PA *in vivo*, essa formulação compreendendo partículas
30 micrométricas de polímero PO que são auto-associadas à pelo menos um PA, o polímero PO sendo, por exemplo, um poliaminoácido cuja cadeia principal seja composta de resíduos aspárticos e/ou resíduos glutâmicos, pelo menos

alguns desses resíduos sendo modificados pelo enxerto de pelo menos um grupo hidrofóbico GH na cadeia e/ou na extremidade da cadeia, PO também sendo biodegradável, solúvel em água e anfifílico.

5 Outro objetivo da invenção é propor produtos derivados a partir da formulação e/ou precursores da formulação mencionados nos objetivos listados acima.

 É para crédito do Requerente ter descoberto que a agregação das nanopartículas da formulação, de acordo com
10 WO 05/051416 em partículas micrométricas contendo íons multivalentes de polaridade oposta àquela dos grupos GI, em proporções bem definidas, leva à seleção de uma população específica de micropartículas que permite um prolongamento significativo do tempo de liberação do PA (por exemplo,
15 proteína ou peptídeo) com o qual essas micropartículas são associadas.

 Também é para crédito do Requerente ter descoberto que certos íons multivalentes levam a uma tolerância excelente das formulações de acordo com a
20 invenção.

 A invenção refere-se, portanto, a uma formulação farmacêutica líquida para liberação prolongada de PA que compreende uma suspensão coloidal aquosa de baixa viscosidade baseada em partículas micrométricas de polímero
25 (PO),

 i. o polímero PO
 . sendo um copolímero solúvel em água, biodegradável, anfifílico portando grupos hidrofóbicos (GH) e grupos hidrofílicos ionizáveis (GI) que são, pelo menos
30 parcialmente, ionizados,

 . e formando espontaneamente uma suspensão coloidal de nanopartículas em água, em pH 7,0, sob condições isotônicas,

ii. as partículas sendo capazes de se associar espontaneamente e não covalentemente com pelo menos um princípio ativo (PÅ), em pH 7,0, sob condições isotônicas,

5 formulação que é caracterizada pelo fato de que
as partículas micrométricas de PO têm um tamanho, medido em
um teste T, entre 0,5 e 100 μm , preferivelmente entre 1 e
70 μm e particularmente preferivelmente entre 2 e 40 μm , e
em que contém íons multivalentes tendo uma valência menor
ou igual a 4, preferivelmente íons divalentes, íons
10 trivalentes ou misturas dos mesmos, de polaridade oposta
àquela dos grupos GI do polímero, os íons multivalentes
tendo sido adicionados para fazer com que as nanopartículas
de polímero agreguem em partículas micrométricas em uma
quantidade tal que a relação r,

15 medida em um teste M, e definida pela fórmula

$$r = n \times \left[\frac{MI}{GI} \right], \text{ onde}$$

- n é a valência dos íons multivalentes,
- [MI] é a concentração molar de íons multivalentes,
- 20 - [GI] é a concentração molar de grupos ionizáveis GI,

está entre 0,3 e 10, preferivelmente entre 0,6 e 5,0, e particularmente preferivelmente entre 0,8 e 3,0.

Essas partículas micrométricas selecionadas de
25 acordo com a invenção são produzidas pela agregação de um
número grande de nanopartículas de copolímero anfifílico.
Essa agregação é vantajosamente causada pela presença de
íons multivalentes de polaridade oposta àquela dos grupos
ionizáveis GI (pelo menos parcialmente ionizados)
30 transportados pelo copolímero. Por complexar com cadeias de
polímero que pertencem a nanopartículas distintas, esses

ions multivalentes de polaridade oposta àquela dos grupos GI do copolímero fazem com que as nanopartículas de polímero floculem em micropartículas.

O PA pode associar espontaneamente com as nanopartículas do copolímero PO antes de agregarem em partículas micrométricas, e/ou pode associar espontaneamente com as partículas micrométricas durante e/ou após agregação.

Além disso, as formulações de acordo com a invenção são não tóxicas e têm boa tolerância local.

Em toda a presente revelação, como distinto a partir de micropartículas tendo um tamanho micrométrico da formulação de acordo com a invenção, o termo "partículas submicrônicas" ou "nanopartículas" indica partículas cujo tamanho (medido em um teste T' descrito abaixo) é maior ou igual a 1 nm e menor do que 500 nm e preferivelmente entre 5 e 250 nm.

Para fins da invenção, o termo "proteína" indica uma proteína ou um peptídeo, quer seja um oligopeptídeo ou um polipeptídeo. Essa proteína ou peptídeo pode ou não ser modificado, por exemplo, pelo enxerto de um ou mais grupos de polioxietileno.

O princípio ativo é designado pela referência PA em toda a presente revelação; PA indica pelo menos um princípio ativo.

Para fins da invenção e em toda a presente revelação, os termos "associação" e "associar" empregados para qualificar as relações entre um ou mais PA e os polímeros PO (por exemplo, poliaminoácidos) indicam que os PA's são ligados aos polímeros PO não covalentemente, por exemplo, por interação eletrostática e/ou hidrofóbica e/ou ligação de hidrogênio e/ou impedimento estérico.

Velocidades angulares para a centrifugação são expressas em rpm (giros por minuto), uma unidade equivalente a uma volta por minuto (r/min) com

$$1 \text{ rpm} = \frac{2\pi}{60} \text{ rad.s}^{-1}.$$

5 Teste T para medir o tamanho das micropartículas por difração a laser

A - Teste T1 no caso onde as micropartículas têm a forma de uma dispersão aquosa

1. Equipamento e condições de operação

Granulômetro laser	Malvern Mastersizer 2000
Módulo	Hydro 2000SM unidade de dispersão de amostra úmida
Volume de fluido de veículo de dispersão	150 ml
Comprimentos de onda (azul e vermelho)	466 e 632 nm
Velocidade de agitação	2400 rpm
Faixa analítica	0,02 μm a 2000 μm
Modelo óptico (Teoria de Mie) Valores de índices refrativos utilizados: Fluido de dispersão (água) Látex de poliestireno	$n_{\text{fluido}} = 1,33 + i.0$ $n_{\text{látex de poliestireno}} = 1,59 + i.0$
Valores de obscuridade para acionar análise	Entre 5% e 20%
Tempo de aquisição	10 s

10 2. Preparação da amostra

A amostra para análise é preparada por diluição de 400 μl da mesma em um tubo de teste de 5 ml com 600 μl

de água desmineralizada e, então, agitando a preparação em um Vortex por 10 s (10 ± 5).

3. Análise da amostra

O fluido em circulação armazenado no sistema de dispersão de amostra úmida em repouso é esvaziado e substituído com água desmineralizada nova. A velocidade de agitação da unidade Hydro 2000SM é ajustada em 2400 rpm.

A medição é iniciada sob as condições experimentais mencionadas acima:

- 1 - alinhamento do feixe laser
- 2 - gravação do ruído de segundo plano

Após essas etapas o operador introduz a amostra para análise do seguinte modo: adição em gotas da amostra diluída (com uma pipeta Pasteur) até que a obscuridade esteja entre 5% e 20%, e iniciação de aquisição.

Os dados são obtidos em relação ao D50, que é o diâmetro abaixo do qual 50% dos objetos analisados são encontrados.

Três medições do D50 são feitas em 3 preparações diferentes e sua média é tirada.

B - Teste T2 no caso onde as micropartículas estão na forma seca

1. Equipamento e condições de operação

Granulômetro laser	Malvern Mastersizer 2000
Módulo	Hydro 2000SM unidade de dispersão de amostra úmida
Volume de fluido de veículo de dispersão	150 ml
Comprimentos de onda (azul e vermelho)	466 e 632 nm
Velocidade de agitação	2000 rpm
Faixa analítica	0,02 μm a 2000 μm

Modelo óptico (Teoria de Mie)	
Valores de índices refrativos utilizados:	
Fluido de dispersão (água)	$m_{\text{fluido}} = 1,39 + i.0$
Látex de poliestireno	$m_{\text{látex de poliestireno}} = 1,59 + i.0$
Valores de obscuridade para acionar análise	Entre 5% e 20%
Tempo de aquisição	10 s

2. Preparação da amostra

Uma solução a 0,1% de Span 80 em heptano é preparada (pesando 0,01 g de Span 80 em pó em um frasco de 20 ml e, então, adicionando heptano a um peso final de 10 g).

Aproximadamente 6 mg de pó são pesados em um tubo de teste de 5 ml.

0,7 g de heptano contendo 0,1% de Span 80 são adicionados ao tubo de teste.

O tubo de teste é colocado em um banho de ultrassom por 2 minutos para dispersar o pó totalmente.

3. Análise da amostra

O fluido em circulação armazenado no sistema de dispersão de amostra úmida em repouso é esvaziado e substituído com heptano. A velocidade de agitação da unidade Hydro 2000SM é ajustada em 2000 rpm.

A medição é iniciada sob as condições experimentais mencionadas acima:

- 1 - alinhamento do feixe laser
- 2 - gravação do ruído de segundo plano

Após essas etapas, o operador introduz a amostra para análise do seguinte modo: adição em gotas da amostra diluída (com uma pipeta Pasteur) até que a obscuridade

esteja entre 5% e 20%, e iniciação de aquisição.

Os dados são obtidos em relação ao D50, que é o diâmetro abaixo do qual 50% dos objetos analisados são encontrados.

- 5 Três medições do D50 são feitas em 3 preparações diferentes e sua média é tirada.

Teste T' para medir o tamanho das nanopartículas por dispersão de luz quase elástica

- 10 O diâmetro hidrodinâmico médio das partículas de polímero PO, de acordo com a invenção, é medido pelo procedimento Md definido abaixo:

- As soluções de PO são preparadas em concentrações de 1 ou 2 mg/ml em 0,15 M de meio NaCl e agitadas por 24 h. Essas soluções são, então, passadas através de um filtro de 15 0,8 - 0,2 μm antes de serem analisadas por dispersão de luz dinâmica utilizando um Sistema Goniômetro Compacto Malvern que opera com um feixe laser He-Ne verticalmente polarizado de 632,8 nm de comprimento de onda. O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de polímero PO é calculado 20 a partir da função de autocorrelação de campo elétrico pelo método de soma, como descrito no livro "Surfactant Science Series" volume 22, Surfactant solutions, ed. R. Zana, capítulo 3, M. Dekker, 1984.

- 25 **Teste M para medir o teor de íon multivalente por cromatografia de íons**

A quantificação do íon multivalente Mg^{2+} será tomada como exemplo. O método é substancialmente igual para determinar os outros cátions (somente os controles mudam).

1. Equipamento e reagentes

- 30 **Cromatografia de íons**

Sistema de cromatografia de íons Dionex ICS 2500 equipado com um detector de condutividade, um supressor de auto-regeneração de cátion e um forno com termostato

Coluna (Dionex): coluna Ion Pac CS16 5x250mm

Coluna de proteção (Dionex): coluna de proteção
Ion Pac CG16 5x50 mm

5 4 mm Supressor de cátion (Dionex): CSRS - ULTRA II -

Garrafa de plástico para cromatografia de íons
(Dionex)

10 Água desmineralizada (MilliQ)
0.1 N de ácido clorídrico (HCl) (Riedel de Haen)
ácido metanossulfônico (MSA) (Aldrich)
sulfato do íon multivalente: por exemplo, MgSO₄
(Aldrich)

2. *Preparação das soluções*

15 solvente: HCl 0,01 N
100 ml de HCl 0,1 N são introduzidos em um frasco
de 1 litro contendo aproximadamente 500 ml de água MilliQ.
O volume é composto de 1 litro com água MilliQ e a solução
é agitada magneticamente.

20 Fase móvel: 30 mM MSA
Utilizando um cilindro graduado, 2 litros de água
MilliQ são introduzidas em uma garrafa de plástico de 2
litros para cromatografia de íons. 3,89 ml de MSA são
adicionados com uma pipeta automática.

25 O frasco é colocado no aparelho e a borbulha com
hélio é iniciada para misturar e desgaseificar a fase.

3. *Preparação dos controles e amostras*

Preparação dos controles

Três controles são preparados em uma faixa de
concentração de Mg²⁺ de 1 mg/l a 2,6 mg/l.

		MgSO ₄	HCl 0,01 N	
SM1	Frasco de 100 ml	50 mg	Compor até 100 ml	Agitação magnética
SM2	Frasco de 100 ml	80 mg	Compor até 100 ml	Agitação magnética
SM3	Frasco de 100 ml	130 mg	Compor até 100 ml	Agitação magnética

Diluições das soluções de estoque são preparadas.

		SMx	HCl 0,01 N
T1	Frasco de 100 ml	1 ml	Compor até 100 ml
T2	Frasco de 100 ml	1 ml	Compor até 100 ml
T3	Frasco de 100 ml	1 ml	Compor até 100 ml

Preparação das amostras

As formulações de micropartículas são agitadas totalmente em um Vortex pouco antes da amostragem, e
5 misturadas com a pipeta automática.

Pelo menos uma diluição é efetuada por adaptação do peso e do volume de diluição para fornecer uma concentração esperada de Mg²⁺ entre 1 mg/l e 2,6 mg/l. A diluição é efetuada em HCl 0,01 N para precipitar o
10 polímero. Diluições sucessivas são efetuadas, se necessário.

A solução é agitada magneticamente por pelo menos 30 minutos.

É passada através de um filtro de 0,45 µm antes
15 de ser transferida para um frasco.

Duas preparações são realizadas por amostra.

4. Condições de cromatografia de íons

Volume de injeção	25 µl
Taxa de fluxo	1 ml/min
Tempo de análise	25 min
Deteção	Condutividade em µS/min

Eluente	30 mM MSA
Temperatura de coluna	40 °C
Supressor	Cátion
Corrente	87 mA

5. *Processamento dos resultados*

Determinação da linha de calibragem

A linha de regressão é obtida considerando-se todos os controles na seqüência. O coeficiente de correlação deve ser > 0,99.

A equação da linha é como a seguir:

$$Y = a X + b$$

onde Y = área do pico de magnésio

X = concentração da solução de controle
(mg/l)

Determinação do teor de íon de magnésio das amostras

$$M = \frac{(Y_{\text{ensaio}} - b) \cdot V_d}{a \cdot P_e}$$

M = teor de Mg^{2+} (g/l)

Y_{ensaio} = área do pico de magnésio para o ensaio

a = inclinação da linha de calibragem

b = ordenada na origem da linha de calibragem

V_d = volume de diluição (ml)

P_e = peso de amostra (mg)

O resultado final é a média de 2 ensaios. O coeficiente de variação genericamente aceito em cromatografia de íons é 10%, porém isso será confirmado quando o método for validado.

Cálculo da razão r

No protocolo acima foi descrito a determinação do teor de magnésio. O teor T de outros cátions multivalentes (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , etc.) é determinado do mesmo modo por um método análogo.

Após determinação do valor de M desse modo, o mesmo é utilizado para deduzir a concentração molar de íon multivalente MI:

$$[MI] = \frac{M}{M_{ion}}, \text{ onde } M_{ion} \text{ é o peso molecular do íon}$$

5 multivalente em g/mol.

Conhecendo-se a estrutura do polímero ionizável, particularmente seu grau teórico de polimerização GP, seu peso molecular teórico M_p e sua taxa de enxerto hidrofóbica (isto é, a fração α_H de grupos modificados por enxertos
10 hidrofóbicos), é possível calcular a concentração molar de grupos ionizáveis para uma concentração de polímero C (expressa em g/l);

$$[GI] = (1 - \alpha_H) \cdot \frac{C \cdot GP}{M_p}$$

Essa é utilizada para calcular $r = n \times \left[\frac{MI}{GI} \right]$,
15 onde é a valência do íon multivalente.

Preferivelmente, a formulação de acordo com a invenção é caracterizada pelo fato de que as partículas micrométricas têm uma densidade de polímero aparente d_{ap} , medida em um teste D descrito abaixo, entre 0,05 e 1,0,
20 preferivelmente entre 0,07 e 0,7, e particularmente preferivelmente entre 0,1 e 0,5.

Teste D para medir a densidade aparente d_{ap}

A suspensão de micropartículas tendo uma concentração C (mg/g) de polímero PO é homogeneizada por
25 agitação magnética. Uma alíquota de 2 ml de suspensão de micropartículas é tirada com uma micropipeta e colocada em um tubo de centrifugação previamente tarado. A suspensão de micropartículas colocada no tubo é, então, pesada (peso m em g). O tubo é colocado em uma centrífuga e girado por 30
30 minutos a 8000 rpm. O sobrenadante é removido com precisão

utilizando micropipetas adaptadas. Isso é utilizado para deduzir o volume de sedimento V_{sed} (em ml):

$$V_{sed} = V_{tot} - V_{sur}$$

A densidade de polímero aparente d_{ap} (em g/cm³) é
5 dada pela fórmula

$$d_{ap} = \frac{\frac{m \cdot c}{V_{sed}}}{1000}$$

A suspensão de partículas micrométricas carregadas com PA proporciona um prolongamento particularmente valioso do tempo de liberação do PA (por
10 exemplo, peptídeo ou proteína terapêuticos) e uma redução do pico de concentração de plasma.

Em particular, o tempo de liberação do PA é significativamente aumentado em relação àquele das formulações da técnica anterior, especialmente aquelas
15 descritas no pedido de patente WO 05/051416. O prolongamento do tempo de liberação do PA *in vivo* que é induzido pelas formulações, de acordo com a invenção, é ainda mais valioso porque o PA (por exemplo, proteínas terapêuticas) são ainda totalmente bioativas e não
20 desnaturadas.

Desse modo, uma característica funcional vantajosa das formulações de acordo com a invenção é que o tempo de liberação T_r de um dado PA, como medido em um teste L, aumenta em relação ao tempo de liberação t_r de uma
25 formulação idêntica não contendo íons multivalentes, como medido no mesmo teste L, esse aumento sendo preferivelmente tal que T_r é maior ou igual a $1,1 \times t_r$ e particularmente preferivelmente de tal modo que T_r seja maior ou igual a $1,5 \times t_r$.

Teste L para medir a liberação do PA a partir das partículas micrométricas de acordo com a invenção

Quadrados de 2 x 2 cm são cortados de um material de polipropileno absorvente.

5 A solução tampão de fosfato, denominada PBS, é preparada por dissolução de 1 tablete de PBS (Aldrich) em 200 ml de água. Isso fornece 200 ml de uma solução contendo tampão de fosfato 0,01 M + cloreto de potássio 0,0027 M e cloreto de sódio 0,137 M.

10 Uma solução tamponada de albumina bovina contendo 30 mg/g, denominada BSA, é preparada pela dissolução de 6 g de albumina de soro bovino, fração V (SAFC), em 294 g de PBS anteriormente preparada.

15 Dois tubos Falcon de 50 ml, um contendo PBS e a outra solução de BSA para embeber os quadrados de material absorvente, são armazenados no refrigerador.

20 4 ou 5 ml dessas soluções são colocadas em tubos herméticos tendo uma capacidade de 5 ml (5 amostras são fornecidas para cada um dos dois meios). Eles são armazenados no refrigerador.

Após um intervalo de 15 horas, os tubos de 5 ml contendo as fases contínuas são colocados a 37 °C uma hora antes.

25 Os quadrados são embebidos por uma hora, 5 na PBS e 5 na BSA (ou mais se houver um problema em injeção), a 37 °C.

30 0,5 ml da formulação são injetados com uma agulha 27G (seringa de 1 ml) no centro de cada quadrado (paralelo a sua superfície), que foi primeiramente limpo levemente em papel.

O lado injetado é anotado.

Esse procedimento é aplicado nos 10 quadrados, que não serão imersos no meio contínuo até posteriormente,

de modo a sincronizar toda a cinética. Os quadrados são colocados de modo que o ponto injetado esteja próximo ao topo do tubo.

As amostras são colocadas em um suporte e são
5 todas introduzidas em um forno a 37 °C, com agitação.

A agitação influencia muito a cinética de liberação e deve ser, portanto, controlada: ajuste de agitação em 40 com 9 cm entre as duas barras de obstrução.

Alíquotas de 100 µl da fase contínua são tiradas
10 em tempos diferentes.

Ensaio da proteína por HPLC

Duas fases de eluição são utilizadas:

- fase A: 1260 ml de água / 680 ml de acetonitrila / 60 ml de THF / 1,8 ml de TFA
- 15 - fase B: 630 ml de acetonitrila / 340 ml de água / 30 ml de THF / 0,8 ml de TFA

As condições HPLC são dispostas na Tabela abaixo:

Instrumento	Agilent 1100 equipado com: - um trocador de amostra automático, resfriado - um detector FLD e UV - um integrador automático		
Coluna	Keystone BetaBasic-18 - 4,6 x 150 mm - 3 µm - tamanho de poro 150 Å		
Gradiente	Tempo (min)	%A	%B
	0	100	0
	15	50	50
	35	10	90
	36	100	0
	40	100	0

Tempo de análise	40 min (+ 20 min de lavagem entre injeções)
Taxa de fluxo	1,5 ml/min
Temperatura de coluna	38 °C
Temperatura de amostra	Resfriado (4 °C)
Volume de injeção	100 µl
Detecção	Absorvância UV a 280 nm Fluorescência a: - 296 nm (excitação) - 300 nm (emissão)

A concentração de proteína no meio contínuo é, então, traçada como uma função de tempo.

A quantidade total de proteína liberada é lida a partir dessa curva quando a última atinge um platô: para
5 que o teste seja válido, esse valor deve representar pelo menos 40% da proteína introduzida no início. O tempo T_r , que é o tempo exigido para liberar 50% do PA introduzido, é, então, lido a partir dessa curva.

De acordo com uma característica preferida, a
10 formulação farmacêutica líquida, de acordo com a invenção, é caracterizada pelo fato de que as partículas micrométricas da suspensão são obteníveis espontaneamente em um líquido aquoso por adição de um sal contendo íons multivalentes, preferivelmente íons divalentes, de
15 polaridade oposta àquela dos grupos GI do polímero PO a uma suspensão de nanopartículas de polímero PO e opcionalmente um PA.

Em uma modalidade preferida, a formulação de acordo com a invenção compreende um PA associado às
20 micropartículas de PO.

Essa formulação tem a vantagem de ser injetável por via parenteral e de ser líquida sob as condições de

injeção.

De acordo com a invenção, os descritores "líquido", "baixa viscosidade" ou "viscosidade muito baixa" correspondem, vantajosamente, a uma viscosidade dinâmica menor ou igual a 1000 mPa.s a 20 °C. Preferivelmente, a viscosidade dinâmica da formulação, medida a 20 °C para um gradiente de cisalhamento de 1000 s⁻¹, é preferivelmente menor ou igual a 500 mPa.s e particularmente preferivelmente entre 2 e 200 mPa.s, por exemplo, entre 1,0 e 100 mPa.s ou entre 1,0 e 50 mPa.s.

Medição da viscosidade dinâmica

A medição de referência para a viscosidade dinâmica pode ser feita, por exemplo, a 20 °C utilizando um reômetro AR1000 (TA Instruments), equipado com uma geometria de cone-e-placa (4 cm, 2°). A viscosidade η é medida para um gradiente de cisalhamento de 1000 s⁻¹.

Essa viscosidade baixa torna as formulações da invenção fáceis de injetar por via parenteral, particularmente pela via de mucosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica, intraperitoneal ou intracerebral ou em um tumor, entre outras coisas.

A formulação, de acordo com a invenção pode ser administrada, também, por via oral, nasal, pulmonar, vaginal, ocular ou bucal.

Esse estado líquido ou de baixa viscosidade das formulações da invenção existe tanto em temperaturas de injeção correspondendo a temperaturas ambiente, por exemplo, entre 4 e 30 °C, e na temperatura fisiológica.

Os polímeros PO úteis na invenção são polímeros biodegradáveis solúveis em água portando grupos hidrofóbicos GH e grupos ionizáveis GI. Os grupos hidrofóbicos podem estar em número reduzido em relação ao resto da cadeia e podem ser ligados lateralmente à cadeia

ou intercalados na cadeia e ser distribuídos aleatoriamente (copolímero aleatório) ou distribuídos na forma de seqüências ou enxertos (copolímeros de bloco ou copolímeros seqüenciados).

5 Em uma modalidade preferida da invenção, os grupos hidrofóbicos GH são ligados lateralmente à cadeia.

 Sem indicar limitação, os polímeros hidrofobicamente modificados PO podem ser selecionados do grupo que compreende poliaminoácidos, (poli)peptídeos,
10 gelatinas, proteínas, polissacarídeos - preferivelmente selecionados do subgrupo que compreende pululanos ou quitosanas ou mucopolissacarídeos ou dextranos ou galactomananos ou polihialuronatos - e misturas dos mesmos.

 Em uma modalidade preferida da invenção, PO é
15 selecionado a partir de (co)poliaminoácidos anfifílicos.

 Para as finalidades da invenção e em toda a presente revelação, o termo "poliaminoácido" abrange poliaminoácidos naturais e sintéticos, juntamente com oligoaminoácidos compreendendo de 10 a 20 "resíduos de
20 aminoácido" e poliaminoácidos compreendendo mais de 20 resíduos de "aminoácido".

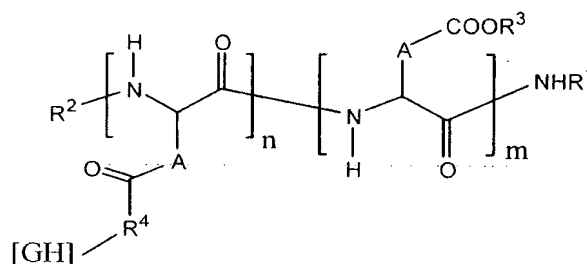
 Preferivelmente, os poliaminoácidos úteis na presente invenção são oligômeros ou homopolímeros compreendendo resíduos de repetição de ácido glutâmico ou
25 aspártico ou copolímeros compreendendo uma mistura desses dois tipos de resíduos de "aminoácido". Os resíduos em questão nesses polímeros são aminoácidos tendo a configuração D, L ou D/L e são ligados através de suas posições alfa ou gama no caso do resíduo glutâmico ou
30 glutamato e via suas posições alfa ou beta no caso do resíduo de aspartato ou aspártico.

 Os resíduos de "aminoácido" preferidos da cadeia de poliaminoácido principal são aqueles tendo a

configuração L e uma ligação do tipo alfa.

Em uma modalidade particularmente preferida da invenção, PO é um poliaminoácido formado de resíduos aspárticos e/ou resíduos glutâmicos, pelo menos alguns desses resíduos portando enxertos que contêm pelo menos um grupo hidrofóbico GH. Esses poliaminoácidos são especialmente do tipo descrito no pedido PCT WO-A-00/30618.

De acordo com uma primeira possibilidade, o PO da formulação é definido pela fórmula geral (I) abaixo:



10

na qual:

R^1 é H, uma alquila C2 a C10 linear ou C3 a C10 ramificada, um radical de benzila, um resíduo terminal de aminoácido, ou $-\text{R}^4-\text{[GH]}$;

15 R^2 é H, um grupo de acila C2 a C10 linear ou C3 a C10 ramificada, um piroglutamato ou $-\text{R}^4-\text{[GH]}$;

R^3 é H ou uma entidade catiônica preferivelmente selecionada do grupo que compreende:

20 - cátions de metal vantajosamente selecionados do subgrupo que compreende sódio, potássio, cálcio e magnésio,

- cátions orgânicos vantajosamente selecionados do subgrupo compreendendo:

25 - cátions baseados em amina;
 - cátions baseados em oligoamina,
 - cátions baseados em poliamina (polietilenimina sendo particularmente preferido), e

- cátions baseados em aminoácido(s) vantajosamente selecionado(s) da classe que compreende cátions baseados em lisina ou arginina,

- e poliaminoácidos catiônicos, 5
vantajosamente selecionados, a partir do subgrupo que compreende polilisina e oligolisina;

R^4 é uma ligação direta, ou um "espaçador", baseada em 1 a 4 resíduos de aminoácido;

A é independentemente um radical $-CH_2-$ (resíduo 10 aspártico) ou $-CH_2-CH_2-$ (resíduo glutâmico);

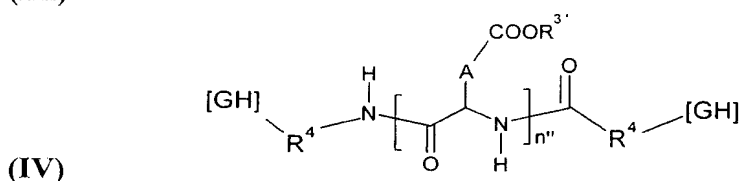
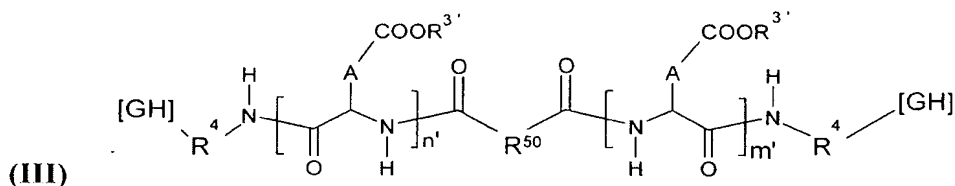
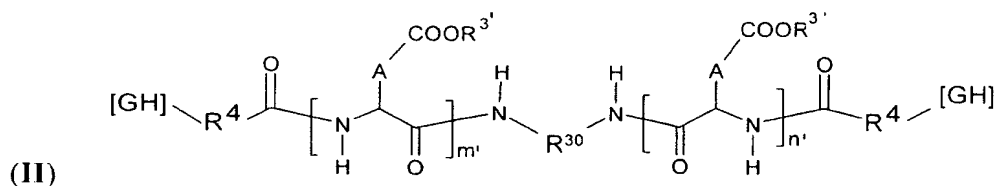
$n/(n + m)$ é definido como a taxa de enxerto molar e seu valor é suficientemente baixo para PO, dissolvido em água em $pH = 7$ e a $25^\circ C$, para formar uma suspensão coloidal de partículas submicrônicas de PO, $n/(n + m)$ sendo 15 preferivelmente entre 1 e 25% mol e particularmente preferivelmente entre 1 e 15% mol;

$(n + m)$ é definido como o grau de polimerização e varia de 10 a 1000 e preferivelmente entre 50 e 300; e

GH é um grupo hidrofóbico.

20 Em uma modalidade preferida da invenção, a formulação é caracterizada pelo fato de que o grupo hidrofóbico GH é derivado a partir de um precursor de álcool selecionado do grupo que compreende octanol, dodecanol, tetradecanol, hexadecanol, octadecanol, álcool 25 de oleíla, tocoferol e colesterol, e em que R^4 é uma ligação direta.

De acordo com uma segunda possibilidade, o PO da formulação tem uma das fórmulas gerais (II), (III) e (IV) abaixo:



em que:

GH é um grupo hidrofóbico;

R³⁰ é um grupo de alquila C2 a C6 linear;

5 R^{3'} é H ou uma entidade catiônica preferivelmente selecionada do grupo que compreende:

- cátions de metal vantajosamente selecionados do subgrupo que compreende sódio, potássio, cálcio e magnésio,
- 10 - cátions orgânicos vantajosamente selecionados do subgrupo compreendendo:
 - cátions baseados em amina;
 - cátions baseados em oligoamina,
 - cátions baseados em poliamina
- 15 (polietilenimina sendo particularmente preferido), e
 - cátions baseados em aminoácido(s) vantajosamente selecionado(s) da classe que compreende cátions baseados em lisina ou arginina,
 - e poliaminoácidos catiônicos,
 - 20 vantajosamente selecionados a partir do subgrupo que compreende polilisina e oligolisina;

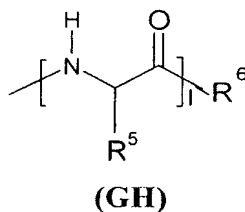
R^{50} é um grupo de alquila C2 a C6, dialcóxi ou diamina;

R^4 é uma ligação direta, ou um "espaçador", baseada em 1 a 4 resíduos de aminoácido;

5 A é independentemente um radical $-\text{CH}_2-$ (resíduo aspártico) ou $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (resíduo glutâmico); e

$(n' + m)$ e n'' são definidos como o grau de polimerização e variam de 10 a 1000 e preferivelmente entre 50 e 300.

10 Vantajosamente, os grupos n GH do PO cada um independentemente entre si, são um radical monovalente da fórmula abaixo:



na qual:

15 R^5 é um radical de metila (alanina), isopropila (valina), isobutila (leucina), sec-butila (isoleucina) ou benzila (fenil alanina);

R^6 é um radical hidrofóbico contendo 6 a 30 átomos de carbono; e

20 l varia de 0 a 6.

De acordo com uma característica digna de nota da invenção, todos ou alguns dos grupos hidrofóbicos R^6 do PO são independentemente selecionados do grupo de radicais compreendendo:

25 - um alcóxi linear ou ramificado contendo 6 a 30 átomos de carbono e capazes de conter pelo menos um heteroátomo (preferivelmente O, N ou S) ou pelo menos uma unidade de insaturação,

- um alcóxi contendo 6 a 30 átomos de carbono,

tendo um ou mais anéis carbocíclicos e opcionalmente contendo pelo menos uma unidade de insaturação ou pelo menos um heteroátomo (preferivelmente O, N ou S), e

- um alcóxi arila ou um arilóxi alquila tendo 7 a 30 átomos de carbono e capaz de conter pelo menos uma unidade de insaturação ou pelo menos um heteroátomo (preferivelmente O, N ou S).

Na prática e sem indicar limitação, o radical hidrofóbico R⁶ do enxerto do PO é derivado de um precursor de álcool selecionado a partir do grupo que compreende octanol, dodecanol, tetradecanol, hexadecanol, octadecanol, álcool de oleíla, tocoferol e colesterol.

Vantajosamente, a cadeia principal do poliaminoácido é:

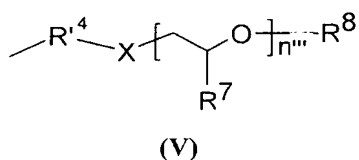
- um homopolímero de alfa-L-glutamato ou alfa-L-glutâmico,
- um homopolímero de alfa-L-aspartato ou alfa-L-aspártico,
- ou um copolímero de alfa-L-aspartato/alfa-L-glutamato ou alfa-L-aspártico/alfa-L-glutâmico.

De forma notável, a distribuição dos resíduos aspártico e/ou glutâmico da cadeia de poliaminoácido principal do PO é tal que o polímero resultante é aleatório ou do tipo em bloco ou do tipo multibloco.

De acordo com outra definição, o PO utilizado na formulação de acordo com a invenção tem um peso molecular entre 2.000 e 100.000 g/mol e preferivelmente entre 5.000 e 40.000 g/mol.

Em uma variante, o PO da formulação de acordo com a invenção contém pelo menos um enxerto do tipo polialquilenol glicol ligado a um resíduo de glutamato e/ou aspartato.

Vantajosamente, esse enxerto é do tipo polialquileno glicol e tem a fórmula (V) abaixo:



na qual:

5 R^4 é uma ligação direta, ou um "espaçador", baseada em 1 a 4 resíduos de aminoácido;

X é um heteroátomo selecionado do grupo que compreende oxigênio, nitrogênio e enxofre;

10 R^7 e R^8 são independentemente H ou uma alquila C1 a C4 linear; e

n''' varia de 10 a 1000 e preferivelmente de 50 a 300.

Na prática, o polialquileno glicol é, por exemplo, um polietileno glicol.

15 É desejável, de acordo com a invenção, que a percentagem molar de enxerto de polialquileno glicol varie de 1 a 30%.

20 Os poliaminoácidos PO são também extremamente valiosos em que, com uma taxa de enxerto ajustável, os mesmos dispersam em água em pH 7,4 (por exemplo com um tampão de fosfato) para fornecer suspensões coloidais.

25 Além disso, alguns PA's, como proteínas, peptídeos ou moléculas pequenas, podem associar-se espontaneamente a nanopartículas compreendendo esses poliaminoácidos PO.

Deve ser entendido que o PO contém grupos ionizáveis que são neutros (por exemplo, COOH) ou ionizados (por exemplo, COO⁻) dependendo do pH e da composição. Por esse motivo, a solubilidade em uma fase aquosa é uma função

direta da proporção de grupos ionizados e conseqüentemente do pH. Em solução aquosa, no caso de grupos de carboxila, o contra-íon pode ser um cátion de metal como sódio, cálcio ou magnésio, ou um cátion orgânico, como trietanol amina, tris-(hidroximetil)amino metano ou uma poliamina como polietilenimina.

O PO do tipo poliaminoácido que é capaz de ser utilizado na formulação da invenção é obtido, por exemplo, por métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Poliaminoácidos aleatórios podem ser obtidos por enxerto do enxerto hidrofóbico, anteriormente funcionalizado com o "espaçador", diretamente sobre o polímero por uma reação de acoplamento convencional. PO de poliaminoácidos em bloco ou multibloco podem ser obtidos por polimerização seqüencial dos anidridos N-carboxi (NCA) de aminoácido correspondente.

Por exemplo, um poliaminoácido de homopoliglutamato ou homopoliaspartato ou um copolímero de glutamato/aspartato em bloco, multibloco ou aleatório é preparado por métodos convencionais.

Para obter um poliaminoácido do tipo alfa, a técnica mais comum se baseia na polimerização de anidridos N-carboxi (NCA) de aminoácido, que é descrita, por exemplo, no artigo intitulado "Biopolymers", 1976, 15, 1869, e no livro de H.R. Kricheldorf intitulado "Alpha-amino acid N-carboxy anhydride and related heterocycles", Springer Verlag (1987). Os derivados de NCA são preferivelmente derivados de NCA-O-Me, NCA-O-Et ou NCA-O-Bz (Me = metila, Et = etila e Bz = benzila). Os polímeros são, então, hidrolisados sob condições apropriadas para fornecer o polímero em sua forma ácida. Esses métodos se baseiam na descrição dada na patente FR-A-2.801.226 do Requerente. Um número de polímeros que pode ser utilizado, de acordo com a invenção, por exemplo, dos tipos poli(alfa-L-aspartico),

poli(alfa-L-glutâmico), poli(alfa-D-glutâmico) e poli(gama-L-glutâmico) de pesos moleculares variáveis, são comercialmente disponíveis. O polímero poliaspártico do tipo alfa-beta é obtido pela condensação de ácido aspártico
5 (para fornecer uma polissuccinimida) seguido por hidrólise básica (cf. Tomida e outros, Polymer, 1997, 38, 4733-36).

O acoplamento do enxerto com um grupo ácido do polímero é facilmente efetuado pela reação do poliaminoácido na presença de uma carbodiimida como agente
10 de acoplamento, e opcionalmente um catalisador como 4-dimetil amino piridina, em um solvente apropriado como dimetil formamida (DMF), N-metil pirrolidona (NMP) ou sulfóxido de dimetila (DMSO). O carbodiimida é, por exemplo, dicicloexil carbodiimida ou diisopropil
15 carbodiimida. A taxa de enxerto é controlada quimicamente pela estequiometria dos constituintes e reagentes ou pelo tempo de reação. Os enxertos hidrofóbicos funcionalizados com um "espaçador" são obtidos por acoplamento de peptídeo convencional ou por condensação direta sob catálise de
20 ácido. Essas técnicas são bem conhecidas por aqueles versados na arte.

Um copolímero em bloco ou multibloco é sintetizado utilizando derivados de NCA anteriormente sintetizados com o enxerto hidrofóbico. Por exemplo, o
25 derivado de NCA hidrofóbico é copolimerizado com NCA-O-Bz e os radicais benzila são, então, seletivamente removidos por hidrólise.

As formulações, de acordo com a invenção, na modalidade preferida na qual compreendem pelo menos um PA,
30 resultam a partir da associação não covalente de nanopartículas com base em um PO e pelo menos um PA, em um meio líquido aquoso.

Para a preparação, o PO ou PA pode estar na forma

sólida (preferivelmente um pó) ou na forma líquida (preferivelmente uma suspensão aquosa coloidal).

Em termos da presente revelação, a associação PA/PO significa que PA é associado ao polímero PÓ (por exemplo, um ou mais poliaminoácidos) por uma ou mais
5 ligações diferentes de ligações químicas covalentes.

As técnicas para associar um ou mais PA com o PO, de acordo com a invenção, são descritas em particular no pedido de patente WO-A-00/30618. Elas consistem em
10 incorporar pelo menos um PA no meio líquido contendo nanopartículas de PO para fornecer uma suspensão coloidal de nanopartículas carregadas ou associadas a um ou mais PA.

Para fins da invenção, o termo "íons multivalentes" indica íons divalentes, íons trivalentes,
15 íons tetraivalentes e misturas desses íons.

No caso onde PO tem grupos aniônicos GI, os íons multivalentes são cátions multivalentes, preferivelmente cátions divalentes e particularmente preferivelmente selecionados do grupo que compreende Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ,
20 Cu^{2+} e misturas dos mesmos, e/ou cátions trivalentes selecionados mais particularmente preferivelmente do grupo que compreende Al^{3+} , Fe^{3+} e misturas dos mesmos.

Além dos íons multivalentes, as formulações de acordo com a invenção podem conter íons monovalentes (por exemplo, cátions) que podem ser ativos na agregação das
25 nanopartículas a micropartículas.

Esses íons multivalentes são preferivelmente introduzidos na formulação da invenção na forma de uma solução de sal aquosa (orgânica ou mineral), por exemplo,
30 uma solução de sulfato, cloreto, acetato, gluconato ou glutamato (ou outro aminoácido aniônico) de cátions multivalentes.

Para melhorar sua estabilidade, a formulação

compreende, preferivelmente, pelo menos um estabilizador selecionado do grupo que compreende:

- nanopartículas de pelo menos um polímero PO, o PO sendo um copolímero solúvel em água, biodegradável, anfifílico contendo grupos hidrofóbicos (GH) e grupos hidrofílicos ionizáveis (GI) que são pelo menos parcialmente ionizados, e espontaneamente formando uma suspensão coloidal de nanopartículas em água, em pH = 7,0 sob condições isotônicas;
- polialquilenos glicóis, preferivelmente polietileno glicóis;
- copolialquilenos glicóis, preferivelmente copolímeros de etileno glicol/propileno glicol (do poloxâmero, tipo Pluronic ou Lutrol);
- polímeros de celulose e derivados dos mesmos, preferivelmente carboxialquila celulosas (por exemplo, carboximetil celulosas) ou alquil celulosas (por exemplo, metil celulosas);
- ésteres de sorbitano e um ou mais ácidos graxos, preferivelmente ésteres de polioxialquilenos (por exemplo, polioxietileno) glicol e pelo menos um ácido (por exemplo, ácido oléico), do tipo Tween ou polysorbate;
- tensoativos baseados em fosfolipídios e polialquilenos glicóis, preferivelmente polietileno glicóis;
- sacarídeos hidrogenados ou não hidrogenados como trehalose, sorbitol, manitol ou sacarose;
- polióis como propileno glicol ou glicerol;
- gelatinas, preferivelmente gelatinas hidrolisadas;
- (co)polímeros contendo nitrogênio, preferivelmente do grupo que compreende poli(acrilamidas, poli-N-vinil amidas, polivinil pirrolidonas (PVP) e poli-N-vinil lactamas;

- álcoois de polivinila (PVA);
- e misturas dos mesmos.

Um dos estabilizadores preferidos, de acordo com a invenção, é feito de nanopartículas de pelo menos um
 5 polímero PO que é idêntico (preferivelmente) ou diferente do polímero que constitui as micropartículas.

A quantidade de estabilizador utilizada na formulação está preferivelmente entre 0,01 e 10% em peso e particularmente preferivelmente entre 0,1 e 5% em peso.

10 Com relação aos estabilizadores compreendendo nanopartículas, essas são vantajosamente utilizadas na formulação em uma quantidade de 1,5 a 3,5% em peso, por exemplo, de 2,0 a 3,0% ($\approx 2,5\%$) em peso.

Com relação ao PA, esse é preferivelmente
 15 selecionado do grupo que compreende proteínas, glicoproteínas, proteínas ligadas a uma ou mais cadeias de polialquilenoglicol [preferivelmente cadeias de polietileno glicol (PEG): Proteínas PEGuiladas], peptídeos, polissacarídeos, lipossacarídeos, oligonucleotídeos,
 20 polinucleotídeos e misturas dos mesmos, e particularmente preferivelmente a partir do subgrupo que compreende eritropoietina, oxitocina, vasopressina, hormônio adrenocorticotrópico, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fatores
 25 de estimulação de hemopoiese e misturas dos mesmos, fatores VIII e IX, hemoglobina, citocromos, prolactina, albuminas, hormônio de liberação de hormônio luteinizante (LHRH), antagonistas de LHRH, competidores de LHRH, hormônios de crescimento bovino ou de porco ou humano (GH), fator de
 30 liberação de hormônio de crescimento, insulina, somatostatina, glucagon, interleucinas ou misturas dos mesmos (IL-2, IL-11, IL-12), α -, β - ou γ -interferon, gastrina, tetragastrina, pentagastrina, urogastrona,

secretina, calcitonina, encefalina, endomorfina, angiotensinas, hormônio de liberação de tirotropina (TRH), fator de necrose de tumor (TNF), fator de crescimento de nervo (NGF), fator de estimulação de colônia de granulócito (G-CSF), fator de estimulação de colônia de macrófago de granulócito (GM-CSF), fator de estimulação de colônia de macrófago (M-CSF), heparinase, proteína morfogênica de osso (BMP), hANP, peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), VEGF, antígeno de superfície de hepatite B recombinante (rHBsAg), renina, citocinas, bradicinina, bacitracinas, polimixinas, colistinas, tirocidina, gramicidinas, ciclosporinas e análogos sintéticos e modificações farmacologicamente ativas e fragmentos de enzimas, citocinas, anticorpos, antígenos e vacinas.

Em uma variante, o PA é uma molécula orgânica hidrofóbica, hidrofílica ou anfifílica "pequena" do tipo que pertence às famílias de antraciclina, taxóide ou camptotecina ou do tipo que pertence à família de peptídeos, como leuprolide ou ciclosporina e misturas dos mesmos.

Em termos da presente revelação, uma molécula "pequena" é especialmente uma molécula de não proteína pequena, por exemplo, uma molécula pequena isenta de aminoácidos.

Em outra variante, o PA é vantajosamente selecionado de pelo menos uma das seguintes famílias de substâncias ativas: agentes para tratar alcoolismo, agentes para tratar doença de Alzheimer, anestésicos, agentes para tratar acromegalia, analgésicos, antiasmáticos, agentes para tratar alergias, agentes anticâncer, anti-inflamatórios, anticoagulantes e antitrombóticos, anticonvulsivos, antiepilépticos, antidiabéticos, antieméticos, antiglaucomas, anti-histaminas,

antiinfeciosos, antibióticos, antifúngicos, antivirais, antiparkinsonianos, anticolinérgicos, antitussivos, inibidores de anidrase carbônica, agentes cardiovasculares, hipolipêmicos, antiarrítmicos, vasodilatadores, antianginais, anti-hipertensivos, vasoprotetores, inibidores de colinestearase, agentes para tratar distúrbios do sistema nervoso central, estimulantes do sistema nervoso central, contraceptivos, promotores de fertilidade, indutores e inibidores de parto, agentes para tratar mucoviscidose, agonistas receptores de dopamina, agentes para tratar endometriose, agentes para tratar disfunções eréteis, agentes para tratar fertilidade, agentes para tratamento de distúrbios gastrointestinais, imunomoduladores e imunossupressores, agentes para tratar distúrbios de memória, antiemélicas, relaxantes musculares, análogos de nucleosídeo, agentes para tratar osteoporose, parassimpatomiméticos, prostaglandinas, agentes psicoterapêuticos, sedativos, hipnóticos e tranqüilizantes, neurolépticos, ansiolíticos, psicoestimulantes, antidepressantes, agentes para tratar distúrbios dermatológicos, esteróides e hormônios, anfetaminas, anoréticos, lenitivos não analgésicos, antiepilépticos, barbitúricos, benzodiazepinas, hipnóticos, laxativos, psicotrópicos e quaisquer associações desses produtos.

A partir do ponto de vista quantitativo, é particularmente valioso se a fração de peso de PA não associada às partículas micrométricas [PA não associado] em % for tal que:

[PA não associado] ≤ 1 ,
preferivelmente [PA não associado] $\leq 0,5$.

Em uma variante, PA pode ser o hormônio de crescimento humano recombinante hGH, tendo uma dose, por

exemplo, compreendida entre 0,2 e 2 mg/kg, e preferivelmente entre 0,5 e 1 mg/kg.

Em outra variante, o PA pode ser insulina, tendo uma dose, por exemplo, compreendida entre 0,2 e 2 UI/kg, e
5 preferivelmente entre 0,5 e 1 UI/kg.

Em outra variante, o PA pode ser interferon α -2b, tendo uma dose, por exemplo, compreendida entre 20 e 100 μ g/kg, e preferivelmente entre 40 e 80 μ g/kg.

Vantajosamente, a formulação de acordo com a
10 invenção é destinada à preparação de remédios, particularmente para administração por via parenteral, mucosa, subcutânea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal ou intracerebral ou intratumoral, ou pela
via oral, nasal, pulmonar, vaginal ou ocular.

15 De acordo com outra de suas características, a invenção refere-se a um processo para a preparação da formulação acima mencionada.

Esse processo para a preparação da formulação é caracterizado pelo fato de consistir essencialmente em:

20 a. tomar ou preparar uma suspensão coloidal de nanopartículas de pelo menos um PO,

b. opcionalmente misturar essa suspensão coloidal de nanopartículas de PO com pelo menos um PA, preferivelmente em solução aquosa,

25 c. opcionalmente filtrar a suspensão resultante,

d. adicionar íons multivalentes (preferivelmente na forma de sal) de polaridade oposta àquela dos grupos GI do polímero PO, os íons multivalentes sendo adicionados em uma quantidade de tal modo que a razão r,

30 definida pela fórmula $r = n \times \left[\frac{MI}{GI} \right]$, onde

- n é a valência dos íons multivalentes,

- [IM] é a concentração molar de íons multivalentes,

- [GI] é a concentração molar de grupos ionizáveis GI,

5 está entre 0,3 e 10, preferivelmente entre 0,6 e 5,0, e particularmente preferivelmente entre 0,8 e 3,0, e

e. se necessário, ajustar o pH ou a osmolaridade (por exemplo, por diafiltração).

10 As formulações líquidas de acordo com a invenção são vantajosamente preparadas em temperatura ambiente (por exemplo, 25 °C).

Diferentes modos de associação do PA com as micropartículas podem ser imaginados (vide supra). Vantajosamente, o PA é associado às nanopartículas que são
15 destinadas a formar as micropartículas por agregação. Também é possível associar o PA diretamente às micropartículas. Os dois métodos de associação podem ser combinados.

Para associação com as nanopartículas ou
20 micropartículas, o PA está vantajosamente na forma de uma solução ou suspensão aquosa para mistura com a suspensão coloidal de nanopartículas ou micropartículas de PO. Em uma variante, o PA poderia ser incorporado na forma sólida e, então, misturado com a suspensão de nanopartículas ou
25 micropartículas.

A presente invenção refere-se ainda a produtos sólidos derivados a partir das nanopartículas e micropartículas de PO contidas na formulação de acordo com a invenção.

30 Na prática, esses produtos derivados podem consistir especialmente em pós, géis, implantes ou filmes, entre outras coisas.

Desse modo, a invenção se refere a produtos

derivados a partir da formulação de acordo com a invenção, tomada como tal, sem se relacionar ao processo para sua preparação. O produto derivado em questão é, portanto, caracterizado pelo fato de que está na forma não líquida e em que compreende partículas micrométricas de polímero (PO),

i. o polímero PO

sendo um copolímero solúvel em água, biodegradável, anfifílico contendo grupos hidrofóbicos (GH) e grupos hidrofílicos ionizáveis (GI),

e formando espontaneamente uma suspensão coloidal de nanopartículas em água, em pH = 7,0, sob condições isotônicas,

ii. as partículas sendo capazes de se associar espontânea e não covalentemente com pelo menos um PA, em pH = 7,0, sob condições isotônicas,

essas partículas micrométricas de PO tendo um tamanho, medido em um teste T, entre 0,5 e 100 μm , preferivelmente entre 1 e 70 μm , e particularmente preferivelmente entre 2 e 40 μm ;

e em que contém derivados de íons multivalentes, preferivelmente íons divalentes, de polaridade oposta àquela do grupo GI do polímero, a razão r,

definida pela fórmula $r = n \times \left[\frac{MI}{GI} \right]$, onde

- n é a valência dos íons multivalentes,
- [MI] é a concentração molar de íons multivalentes,
- [GI] é a concentração molar de grupos ionizáveis GI,

está entre 0,3 e 10, preferivelmente entre 0,6 e 5,0, e particularmente preferivelmente entre 0,8 e 3,0.

Esse produto derivado pode consistir, por exemplo, em um pó ou um gel.

A presente invenção refere-se ainda a esses produtos derivados a partir da formulação de acordo com a invenção como intermediários resultando a partir da
5 preparação da formulação de acordo com a invenção. A invenção, portanto, refere-se ainda a um processo para a preparação de pelo menos um desses produtos derivados. Esse processo é caracterizado pelo fato de que consiste
10 essencialmente em secar a suspensão de partículas micrométricas para fornecer uma forma sólida, preferivelmente um pó de partículas micrométricas, que é capaz de ser armazenado ou administrado.

Tais produtos derivados fornecem acesso a outro
15 método de preparar a formulação de acordo com a invenção. O processo de acordo com esse método é caracterizado pelo fato de que consiste essencialmente em:

- tomar pelo menos um produto derivado obtido pelo processo como definido acima,
- 20 - e misturar esse produto derivado com água ou uma solução aquosa S de reconstituição.

No caso mencionado por último, a formulação farmacêutica líquida é reconstituída imediatamente antes do uso por mistura do produto derivado sólido (por exemplo,
25 pó) com água ou S antes da injeção.

Por exemplo, S pode compreender uma solução aquosa e pode simplesmente ser água para preparações injetáveis.

- Além disso, S pode opcionalmente conter:
- 30 - pelo menos um tampão ou pelo menos um sal injetável (tampão de fosfato, tampão de citrato, cloreto de sódio) em uma concentração, por exemplo, entre 0,001 M e 0,1 M, preferivelmente entre 0,005 M e 0,02 M, esse tampão

ou esse sal injetável tornando possível ajustar o pH da solução; e

- pelo menos um tensoativo injetável, preferivelmente do tipo polissorbate, como Tween® 20 ou
5 Tween® 80, ou do tipo poloxâmero, como Lutrol® F38, Lutrol® F68 ou Lutrol® F127, em concentrações, por exemplo, entre 0,01 e 2%, e preferivelmente entre 0,05 e 0,5%.

S pode conter também agentes de densificar como
10 sacarídeos, a saber: sacarose, D-manitol ou trealose, em concentrações entre 0,1 e 10%, e preferivelmente entre 0,5 e 5%. A solução de reconstituição também pode conter um polímero de viscosificar injetável selecionado a partir do grupo que compreende polissacarídeos, polímeros sintéticos
15 (por exemplo, carboximetil celulose de sódio), álcool de polivinila, polivinil pirrolidona, polialquilenoglicóis (por exemplo, polietileno glicóis) e misturas dos mesmos.

Mais genericamente, os exemplos de excipientes que podem ser adicionados à formulação de acordo com a
20 invenção são antimicrobianos, tampões, antioxidantes e agentes de ajuste de isotonicidade conhecidos por aqueles versados na técnica. Pode-se fazer referência, por exemplo, ao livro intitulado *Injectable Drug Development*, P.K. Gupta e outros, Interpharm Press, Denver, Colorado, 1999.

25 De acordo com a invenção, pode-se considerar fazer provisão para uma filtração de esterilização, em filtros com uma porosidade, por exemplo, de 0,2 µm, da suspensão líquida de nanopartículas que dão origem às partículas micrométricas da formulação de acordo com a
30 invenção. A agregação sob condições estéreis de acordo com os modos de preparação descritos acima permite, desse modo, que a formulação seja injetada diretamente em um paciente.

As propriedades principais da formulação, de acordo com a invenção, incluem sua capacidade de liberar o PA durante um período prolongado maior do que aquele obtido com uma suspensão coloidal de nanopartículas do mesmo polímero, administrado no mesmo pH, com a mesma concentração de proteína e concentração de polímero.

A presente invenção refere-se ainda a um processo para a preparação de remédios, particularmente para administração pela via parenteral, mucosa, subcutânea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal ou intracerebral ou intratumoral, ou pela via oral, nasal, pulmonar, vaginal ou ocular, caracterizado pelo fato de que consiste essencialmente em utilizar uma formulação como definida acima *per se*, ou uma formulação obtida pelo processo também definido acima, ou qualquer produto derivado a partir da formulação, ou qualquer precursor da formulação.

Embora a formulação de acordo com a invenção seja preferivelmente farmacêutica, isso não exclui formulações cosméticas, dietéticas ou fitossanitárias, compreendendo pelo menos um PO como definido acima e pelo menos um PA.

A invenção refere-se ainda a um método de tratamento terapêutico consistindo essencialmente em administrar a formulação como descrito na presente exposição pela via parenteral, mucosa, subcutânea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal ou intracerebral ou em um tumor, ou pela via oral, nasal, pulmonar, vaginal ou ocular.

Em uma variante específica da invenção, esse método de tratamento terapêutico consiste em administrar a formulação, como descrito acima, por injeção pela via parenteral, subcutânea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal ou intracerebral ou intratumoral,

preferivelmente de tal modo que forme um depósito no sítio de injeção.

A invenção será entendida mais claramente e suas vantagens e variantes tornar-se-ão evidentes a partir dos
 5 Exemplos abaixo, que descrevem a síntese do PO formado de poliaminoácidos enxertados com um grupo hidrofóbico, e sua conversão em um sistema para a liberação prolongada de PA, ou seja, uma formulação de acordo com a invenção (suspensão coloidal aquosa estável), e demonstram a capacidade de tal
 10 sistema não somente associar a uma proteína terapêutica, como também, em particular, formar gel/reticular para liberar a proteína terapêutica em um modo muito prolongado *in vivo*.

DESCRIÇÃO DA FIGURA

15 A Figura é uma curva que mostra a liberação de hormônio de crescimento humano [hGH em % relativa para a concentração total injetada] como uma função de tempo [t em min] no teste L, de acordo com o fato de se está incluído em nanopartículas de PO [■ nanopartículas 23 mg/g] ou
 20 micropartículas de PO [♦ micropartículas 73 mg/g] preparadas de acordo com o exemplo 8.

EXEMPLOS

Exemplo 1: polímero anfifílico PO

Síntese de poliglutamato enxertado com alfa-tocoferol de
 25 origem sintética

15 g de um ácido alfa-L-poliglutâmico (tendo um peso molecular equivalente a aproximadamente 16.900 Da, relativo a um padrão de polioxietileno, e obtido pela polimerização de NCAGluOMe seguido por hidrólise, como
 30 descrito no pedido de patente FR-A-2.801.226) são solubilizados em 288 ml de dimetil formamida (DMF) por aquecimento a 80 °C até a solubilização do polímero. A solução é resfriada a 15 °C e 2,5 g de D,L-alfa-tocoferol

(> 98%, obtido a partir de Fluka®), anteriormente solubilizado em 8 ml de DMF, 280 mg de 4-dimetil amino piridina, anteriormente solubilizada em 1 ml de DMF e 1,6 g de diisopropil carbodiimida, previamente solubilizado em 6 ml de DMF, são adicionados em sucessão. Após agitar por 3 horas, o meio de reação é derramado em 1200 ml de água contendo 15% de cloreto de sódio e ácido clorídrico (pH = 2). O polímero que precipita é, então, recuperado por filtração e lavado com ácido clorídrico 0,1 N, com água e com éter diisopropílico. O polímero é, então, seco em um forno a vácuo a 40 °C para fornecer um rendimento da ordem de 90%. O peso molecular medido por cromatografia de exclusão de tamanho é 15.500, em relação a um padrão de polioxietileno. A proporção de tocoferol enxertado, estimada por espectroscopia NMR de próton, é 5,1% mol. Uma suspensão de nanopartículas do polímero em água é obtida por solubilização do mesmo em água, e pelo ajuste do pH (neutralização dos carboxilatos) para 7 ± 1 .

Exemplo 2: preparação de 100 g de uma suspensão coloidal de nanopartículas de polímero PO carregado com hGH

2.1 Preparação de uma solução coloidal de polímero anfifílico PO

O polímero é deixado em repouso em solução durante a noite para atingir uma temperatura constante de 30 °C.

35,3 g de polímero PO do Exemplo 1 são pesados.

Ele é diluído com 26,65 g de água estéril para injeção (para um polímero PO em uma concentração de 28,4 mg/g).

A solução de polímero é agitada magneticamente.

A osmolaridade da solução é ajustada para 300 ± 20 mOsm por introdução de 1,89 g de uma solução aquosa

5,13 M de NaCl (30% peso/peso).

O pH é ajustado para $7,4 \pm 0,2$ por adição de 0,38 g de solução de NaOH 1 N.

Isso fornece 64,22 g de uma solução de polímero
5 contendo 15,61 mg/g.

2.2 associação da proteína com o polímero

Uma solução de hormônio de crescimento humano recombinante, denominado hGH, é descongelada a 25 °C por 90 min.

10 35,92 g de solução de hGH (concentrada, 3,9 mg/g) são, então, adicionados a 64,15 g da solução coloidal previamente preparada do polímero, com agitação.

A solução carregada com proteína é curada por 2 h em temperatura ambiente.

15 Ela é, então, passada através de um filtro de 0,8 - 0,2 μm e deixada curar durante a noite.

Isso fornece 100 g de uma formulação pronta para injetar contendo 1,4 mg/g de hGH e 10 mg/g de polímero do tipo PO.

20 **Exemplo 3: preparação de uma suspensão de partículas micrométricas utilizando MgCl_2**

A suspensão é preparada a partir de uma solução preparada de acordo com o exemplo 2 com pH e osmolaridade ajustados e contendo 10,0 mg/g de PO.

25 a) Floculação da solução por adição de solução de MgCl_2 1 M utilizando uma seringa de ação controlada que fornece aproximadamente 20 ml/h, com agitação (ajuste nº 9). A razão que caracteriza a adição de cátions:

$$r = 2 \times \frac{[\text{Mg}^{2+}]}{[\text{Glu}]}$$

30 é igual a 3,36 nesse caso. Uma solução contendo 8,51 mg/g de PO é obtida.

b) Centrifugação por 25 min a 2500 rpm. O sobrenadante claro tem uma osmolaridade de 646 mOsm.

c) Lavagem do resíduo com água estéril (1/8 do volume de solução inicial) e centrifugação por 10 min a 2500 rpm. O sobrenadante claro tem uma osmolaridade de 350 mOsm.

d) Centrifugação por 10 min a 2500 rpm.

Essa formulação é caracterizada como a seguir:

pH	6,64
Osmolaridade	349 mOsm
[PO]	50,77 mg/g
Diâmetro de partícula D50 (de acordo com o teste T1)	20 μ m

Exemplo 4: preparação de uma suspensão de micropartículas produzidas com CaCl_2 e com diminuição de pH

A suspensão é preparada a partir de uma solução preparada de acordo com o exemplo 2 tendo características finais de 1,2 mg/g de hGH e 25,9 mg/g de PO.

a) Ajuste da formulação inicial para pH = 5,52 com HCl 0,1 N utilizando uma seringa de ação controlada que fornece aproximadamente 70 ml/h, com agitação (600 rpm).

b) Floculação do polímero pela adição de solução de CaCl_2 1 M utilizando uma seringa de ação controlada que fornece aproximadamente 39 ml/h, com agitação (600 rpm). A razão que caracteriza a adição de cátions:

$$r = 2 \times \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{[\text{Glu}]}$$

é igual a 1,68 nesse caso.

c) Centrifugação por 8 min a 2500 rpm. O sobrenadante claro tem um pH de 4,73 e uma osmolaridade de 653 mOsm.

d) Lavagem do resíduo com água MilliQ (1/8 do

volume de solução inicial) e centrifugação por 4 min a 2500 rpm. O sobrenadante claro tem um pH de 4,72 e uma osmolaridade de 378 mOsm.

e) Concentração do resíduo por centrifugação por 4 min a 2500 rpm para fornecer uma suspensão concentrada.

A suspensão obtida tem as seguintes características:

pH	4,88
Osmolaridade	386 mOsm
[PO]	122,88 mg/g
[hGH]	4,9 mg/g
Diâmetro de partícula D50 (de acordo com o teste T1)	23 μ m

Exemplo 5: preparação de uma suspensão de micropartículas produzida com CaCl_2

A suspensão é preparada a partir de uma solução preparada de acordo com o exemplo 2 tendo características finais de 1,2 mg/g de hGH e 26,01 mg/g de PO.

a) Floculação da formulação inicial pela adição de solução de CaCl_2 1 M utilizando uma seringa de ação controlada que fornece aproximadamente 40,2 ml/h, com agitação (600 rpm), até que a razão r seja 3,36. Isso fornece uma formulação contendo 0,93 mg/g de hGH para 20,28 mg/g de PO.

b) Centrifugação por 4 min a 2500 rpm. O sobrenadante claro tem um pH de 6,34 e uma osmolaridade de 832 mOsm.

c) Lavagem do resíduo com água MilliQ (1/3 do volume de solução inicial) e centrifugação por 8 min a 2500 rpm. O sobrenadante claro tem um pH de 6,56 e uma osmolaridade de 334 mOsm.

d) Concentração do resíduo por centrifugação por 8 min a 2500 rpm para fornecer uma suspensão concentrada.

Essa formulação é caracterizada como a seguir:

pH	6,25
Osmolaridade	343 mOsm
[PO]	101,87 mg/g
[hGH]	4,7 mg/g
Diâmetro de partícula D50 (de acordo com o teste T1)	13 μ m

Exemplo 6: preparação de uma suspensão de micropartículas produzida com ZnCl_2

A suspensão é preparada a partir de uma solução preparada de acordo com o exemplo 2 tendo características finais de 1,4 mg/g de hGH e 10,00 mg/g de PO.

a) Floculação da solução pela adição de solução de ZnCl_2 1 M utilizando uma seringa de ação controlada que fornece aproximadamente 20 ml/h, com agitação (ajuste nº 9), até que a razão r seja 1,54. Uma solução contendo 9,64 mg/g de PO é obtida.

b) Centrifugação por 4 min a 2500 rpm. O sobrenadante claro tem uma osmolaridade de 389 mOsm.

c) Lavagem do resíduo com água estéril (1/13 do volume de solução inicial) e centrifugação por 8 min a 2500 rpm. O sobrenadante claro tem uma osmolaridade de 237 mOsm.

d) Lavagem do resíduo com 0,9% de NaCl (1/8 do volume de solução inicial). Centrifugação por 8 min a 2500 rpm. O sobrenadante claro tem uma osmolaridade de 253 mOsm. A concentração teórica calculada é então 64,97 mg/ml.

Essa formulação é caracterizada como a seguir:

pH	5,86
Osmolaridade	256 mOsm
[PO]	63,51 mg/g

Diâmetro de partícula D50 (de acordo com o teste T1)	9 μm
---	-----------------

Exemplo 7: preparação de uma suspensão de micropartículas produzida com MgCl_2 sob condições 1

A suspensão é preparada a partir de uma solução preparada de acordo com o exemplo 2 tendo características
5 finais de 0,48 mg/g de hGH e 23,05 mg/g de PO, com pH e osmolaridade ajustados.

a) Diluição até 10,0 mg/g com 0,9% de NaCl.

b) Floculação da solução pela adição de solução de MgCl_2 , $6\text{H}_2\text{O}$ 1 M utilizando uma seringa de ação
10 controlada que fornece aproximadamente 20 ml/h, com agitação (ajuste nº 10), até que a razão r seja 6,93. Isso fornece uma solução contendo 8,59 mg/g de PO.

c) Centrifugação por 10 min a 2500 rpm. O sobrenadante claro tem uma osmolaridade de 654 mOsm.

d) Lavagem do resíduo com água estéril (1/7 do volume de solução inicial) e centrifugação por 10 min a 2500 rpm. O sobrenadante claro tem uma osmolaridade de 291 mOsm.

Essa formulação é caracterizada como a seguir:

pH	6,56
Osmolaridade	323 mOsm
[PO]	75,7 mg/g
[hGH]	1,3 mg/g
Diâmetro de partícula D50 (de acordo com o teste T1)	8,6 μm

Exemplo 8: preparação de uma suspensão de micropartículas produzidas com MgCl_2 de acordo com as condições 2

A suspensão é preparada a partir de uma solução preparada de acordo com o exemplo 2 tendo características
25 finais de 1,33 mg/g de hGH e 10,10 mg/g de PO, com

osmolaridade e pH ajustados.

a) Floculação da solução na presença de uma varredura de nitrogênio pela adição de solução de MgCl_2 , $6\text{H}_2\text{O}$ 2 M borbulhado com nitrogênio utilizando uma bomba que
5 fornece aproximadamente 8 ml/min, com agitação (500 rpm) até que a razão r seja 10,01. Isso fornece uma solução contendo 8,98 mg/g de PO e tendo uma osmolaridade de 914 mOsm.

b) Cura por três horas, com agitação.

10 c) Uso de um módulo Microza (UJP-0047R - Pall), tendo uma área superficial específica de $0,02 \text{ m}^2$. Esse módulo foi primeiramente condicionado (remoção do glicerol e etanol por embebedimento em água), despirogenado (7% de NaOH seguido por enxágue com água) e submetido à autoclave.

15 d) Condicionamento do módulo com solução de MgCl_2 tendo uma osmolaridade de 900 mOsm.

e) Lavagem com água estéril (1,04 vezes o volume de formulação floculada), que é adicionada em uma taxa de 8 ml/min para manter o volume geral constante. A circulação
20 é assegurada com uma bomba em 25% de potência, mantendo uma pressão de 0,3 bar. Essa etapa dura 3 h. O filtrado claro tem uma osmolaridade final de 459 mOsm.

f) Uso de um módulo Microza ($0,02 \text{ m}^2$) cuja circulação é assegurada com uma bomba em 25% de potência.
25 Concentração com uma taxa de fluxo de permeado de 4,4 ml/min. Essa etapa dura 160 min. O filtrado tem uma osmolaridade final de 324 mOsm.

Essa formulação, que é uma suspensão de fluido branco, possui as seguintes características:

Osmolaridade	329 mOsm
[Mg]	6,8 mg/g
[micropartículas]	43,6 mg/g

[hGH]	4,56 mg/g
r (de acordo com o teste M)	2,30
T _r (de acordo com o teste L)	16 h
d _{ap} (de acordo com o teste D)	0,15

Exemplo 9: preparação de uma suspensão estável de micropartículas produzidas com MgCl₂ de acordo com as condições 3

a) Preparação de uma solução de PO preparada de acordo com o exemplo 2, doravante denominada formulação inicial hGH 1,4 mg/g / PO 10 mg/g

Uma solução de hormônio de crescimento humano recombinante é descongelada por 2 h em 25 °C ([hGH] = 3,9 mg/ml, pH = 7,2, 330 mOsm).

O polímero PO é diluído e ajustado (300 mOsm, pH = 7,4, 15,6 mg/g).

A solução de hGH é derramada sobre o polímero, e a mistura de hGH/PO (1,4/10 mg/g) é, então, desgaseificada.

A associação é efetuada durante a noite em temperatura ambiente.

PO pH = 7,4 - 300 mOsm	M (PO)	2317,90 g
	[PO]	15,61 mg/g
hGH	M (hGH)	1302,30 g
	[hGH]	3,9 mg/g
Formulação inicial	M	3497,00 g
	[hGH]	1,35 mg/g
	[PO]	10,01 mg/g

b) Preparação das 5 mg/g de micropartículas hGH/40 mg/g micropartículas de Mg

A formulação inicial é floculada pela adição controlada de MgCl₂ 2 M com uma razão r de 9,01, após o que tudo é deixado curar por 1 h (maturação).

A suspensão é lavada com água por microfiltração

tangencial (Módulo Microza a partir de Pall com uma área superficial específica de $0,32 \text{ m}^2$) até que a osmolaridade seja de aproximadamente 300 mOsm. Ela é, então, concentrada a uma concentração de PO entre 38 e 41 mg/g.

Formulação inicial	M	3458,4 g
	[hGH]	1,399 mg/g
	[PO]	10,01 mg/g
Floculação	M (MgCl_2 , 2M)	457,6 g
	Taxa de fluxo	8,47 g/min
	M (suspensão)	3883,4 g
	[PO]	8,84 mg/g
	Osmolaridade	942 mOsm
Lavagem	M (H_2O)	4241 g
	Taxa de fluxo	42,43 mg/min
	Osmolaridade	330 mOsm
Concentração	M (filtrado)	3157 g
	Taxa de fluxo	39,46 mg/min
	M (micropartículas concentradas)	713,8 g
	[hGH]	5,28 mg/g
	[PO]	50,9 mg/g
Diluição	M (MgCl_2 , 0,1 M)	179,9 g
	M (micropartículas concentradas)	893,7 g
	[hGH]	4,22 mg/g
	[PO]	40,65 mg/g

5 c) Preparação da formulação misturada 5 mg/g de hGH/40 mg/g micropartículas de Mg/23 mg/g de PO

As micropartículas são estabilizadas pela adição do polímero do tipo PO em sua forma liofilizada.

10 O liofilizado é adicionado à suspensão, com agitação.

Tudo é colocado sob vácuo (30 mbar) até o dia seguinte, com agitação.

Suspensão	M (micropartículas concentradas)	872,5 g
PO liofilizado	[H ₂ O]	10,125%
	M adicionado	23,175 g
Formulação final	M	895,68 g
	[hGH]	4,11 mg/g
	[PO em micropartículas]	39,60 mg/g
	[PO adicionado]	23,00 mg/g
	pH	6,4
	Osmolaridade (mOsm)	409
	[Mg] (g/l)	4,0
	r (de acordo com teste M)	0,94
	d _{ap} (de acordo com o teste D)	0,14
	T _r (de acordo com o teste L)	30,56 h

Exemplo 10: preparação de partículas micrométricas secas carregadas com hGH a partir de uma suspensão de micropartículas por uma primeira modalidade do processo de acordo com a invenção

Primeiramente, uma suspensão de micropartículas carregadas com hGH é produzida sob as condições descritas nas etapas a) até e) do exemplo 8 (floculação, cura, lavagem). A suspensão é lavada até que a osmolaridade seja de aproximadamente 280 mOsm. A suspensão, contendo aproximadamente 10 mg/g de polímero é, então, liofilizada em um aparelho Bioblock ALPHA 1-4 LSC após ter sido congelada em nitrogênio líquido por 76 h.

Reconstituição e caracterização da suspensão

1 ml de água para preparações injetáveis é adicionado a 40 mg de pó. A solução é agitada com a mão por alguns segundos para efetuar umedecimento homogêneo do pó. A solução é deixada em repouso por aproximadamente 10 minutos. Ela é homogeneizada por alguns segundos por agitação manual e retirada utilizando uma agulha de 21G para fornecer 1 ml de uma solução pronta para injetar.

As características da suspensão são descritas abaixo.

$r = 2 \times \left[\frac{Mg^{2+}}{COO^-} \right]$ (de acordo com teste M)	pH	Osmolaridade	d_{ap} (mg/ml) (de acordo com teste D)
1,4	6,6	338	0,10

Exemplo 11: preparação de partículas micrométricas secas de polímero carregado com hGH a partir de uma suspensão de micropartículas por uma segunda modalidade do processo de acordo com a invenção

Primeiramente, uma suspensão de micropartículas carregadas com hGH é produzida sob as condições descritas nas etapas a) a e) do exemplo 8 (floculação, cura, lavagem). A suspensão é lavada até que a osmolaridade seja de aproximadamente 280 mOsm. A suspensão, contendo aproximadamente 10 mg/g de polímero é, então, seca em um aparelho de atomização Buchi B290. A solução líquida é retirada em uma taxa de 5 ml/min e nebulizada através de um bocal de pulverização alimentado com nitrogênio (7 bar - 500 l/h). A taxa de retirada (ar de secagem) é 40 m³/h. A temperatura de entrada é mantida a 90 °C, o que induz uma temperatura de saída de 45 °C sob essas condições.

Sob essas condições, o tamanho $D(0,5)$ das

partículas obtidas (de acordo com o teste T2) é 5 μm (50% do volume são ocupados por partículas tendo um diâmetro de < 5 μm).

Reconstituição e caracterização da suspensão

5 1 ml de água para preparados injetáveis é adicionado a 30 mg de pó. A solução é agitada com a mão por alguns segundos para efetuar umedecimento homogêneo do pó. A solução é deixada em repouso por aproximadamente 10 minutos. Ela é homogeneizada por alguns segundos por
10 agitação manual e retirada utilizando uma agulha 21G para fornecer 1 ml de uma solução pronta para injetar.

As características da suspensão são descritas abaixo.

$r = 2 \times \left[\frac{Mg^{2+}}{COO^-} \right]$ (de acordo com teste M)	pH	Osmolaridade	Tamanho D(0,5) μm (de acordo com o teste T1)	d_{ap} (mg/ml) (de acordo com o teste D)
2,3	6,8	598	10,0	0,15

**Exemplo 12: farmacocinética de hGH no cão após
15 injeção subcutânea de várias formulações com base em poliaminoácidos anfifílicos na forma de nanopartículas e micropartículas**

Doze cães beagle simples (pesando 7 a 10 kg) foram tratados com as seguintes formulações:

Formulação	Número de cães	[hGH] (mg/ml)	[PO] (mg/ml)	Dose (mg/kg)	Volume de dose (ml/kg)
hGH IR	4	4	0	1	0,23
Formulação 1	4	5	22,6	1	0,22
Formulação 2	4	5	117,5	1	0,20

20 O hGH IR corresponde a uma solução de hormônio de crescimento humano recombinante ([hGH] = 4 mg/ml, pH = 7,2,

330 mOsm).

A formulação 1 é preparada de acordo com o Exemplo 2 e a formulação 2 de acordo com o exemplo 7. O hGH é ensaiado por ELISA (kit DSL 10-1900).

5 Os dados farmacocinéticos são dispostos na Tabela abaixo:

Formulação	$C_{\max} \pm$ SD (ng/ml)	$T >$ 5 ng/ml $\pm$ SD (h)	$AUC_{0-\text{último}} \pm$ SD (ng.h/ml)	RBA (%)	$T_{50\%auc} \pm$ SD (h)
hGH IR	$582 \pm$ 155	18 ± 3	3209 ± 276	100	4 ± 1
Formulação 1	$135 \pm$ 37	44 ± 6	2579 ± 516	80	25 ± 5
Formulação 2	25 ± 5	129 ± 26	1759 ± 246	55	$121 \pm$ 33

onde:

$C_{\max}$ é a concentração máxima de hGH em soro;

10 $T > 5$ ng/ml é o tempo quando a concentração de hGH em soro é maior do que 5 ng/ml,

AUC representa a área sob a curva de concentração de hGH em soro como uma função de tempo,

RBA representa a biodisponibilidade relativa a uma formulação de liberação imediata,

15 $T_{50\%auc}$ representa o tempo necessário para liberar 50% do hGH total liberado.

O hGH IR tem um perfil de liberação rápida com uma concentração máxima de soro de 582 ± 155 ng/ml atingida após um tempo médio de 2 horas. O hGH é, então, eliminado
20 relativamente rapidamente ($T_{1/2}$ aparente de aproximadamente 2 horas) de acordo com uma diminuição mono-exponencial. O hGH em circulação não mais é quantificável além de 24 horas.

A formulação 1 tem um perfil de liberação de hGH prolongado com uma fase de absorção lenta antes de atingir concentrações de soro máximas comparáveis (44 ± 6 e 37 ± 4 ng/ml, respectivamente) após um tempo mediano de 24 horas. A inclinação de eliminação indica a ausência de hGH quantificável além de 48 horas (a concentração de soro sendo $4,8 \pm 3,1$ ng/ml).

Essa formulação demonstra nesse caso uma liberação mais lenta de hGH no compartimento de sangue, como ilustrado pelo deslocamento em $C_{\max}$ centrado em torno de 24 horas. Entretanto, esse fenômeno não parece prolongar a presença do hGH no soro de forma significativa, uma vez que a concentração em circulação em 48 horas parece ser zero. A AUC da formulação 1 parece levemente reduzida em relação ao IR de referência: a biodisponibilidade é 80%.

A formulação 2, por outro lado, oferece uma modificação maior do perfil farmacocinético com uma liberação muito lenta após um tempo de retardo de 4 horas e, então, uma concentração máxima de soro de 25 ± 5 ng/ml atingida após um tempo médio de 108 horas (faixa: 72-168 horas). A tendência geral da farmacocinética da formulação 2 é um perfil muito plano na forma de um pseudoplatô do tipo semelhante à infusão. O nível de hGH em circulação retorna a uma concentração não quantificável entre 168 e 240 horas (7 e 10 dias).

Essa formulação tem uma AUC muito menor: 45% de perda de biodisponibilidade relativa (RBA = 55%).

Exemplo 13: farmacocinética de hGH no cão após injeção subcutânea de uma formulação baseada em poliaminoácidos anfifílicos na forma de micropartículas

Doze cães beagle simples (pesando 7 a 10 kg) foram tratados com as seguintes formulações:

Formulação	Número de cães	[hGH] (mg/ml)	[PO] (mg/ml)	pH/ mOsm	Dose (mg/kg)	Volume de dose (ml/kg)
hGH IR	6	4,1	0	7,4/ 321	5 x 0,1 por dia	0,024
Formulação 3	6	4,3	64,2	6,4/ 409	0,5	0,122

O hGH IR corresponde a uma solução de hormônio de crescimento humano recombinante ([hGH] = 4,1 mg/ml, pH = 7,2, 330 mOsm). A formulação 3 é preparada de acordo com o exemplo 9.

5 Os dados farmacocinéticos são dispostos na tabela abaixo:

Formulação	$C_{\max} \pm SD$ (ng/ml)	$T > 1 \text{ ng/ml} \pm SD$ (h)	$AUC_{0-\text{último}} \pm SD$ (ng.h/ml)	RBA (%)	$T_{50\%auc} \pm SD$ (h)
hGH IR	90 ± 24	39	258 ± 26	100	$2 \pm 0,3$
Formulação 3	26 ± 16	108 ± 38	999 ± 294	77	66 ± 14

onde:

$C_{\max}$ é a concentração máxima de hGH em soro;

10 $T > 1 \text{ ng/ml}$ é o tempo quando a concentração de hGH em soro é maior do que 1 ng/ml,

AUC representa a área sob a curva de concentração de hGH em soro como uma função de tempo,

RBA representa a biodisponibilidade relativa a uma formulação de liberação imediata,

15 $T_{50\%auc}$ representa o tempo necessário para liberar 50% do hGH total liberado.

As micropartículas liberam o hGH em mais de 5 dias com uma perda de 23% de biodisponibilidade.

Exemplo comparativo 14: liberação *in vitro* (teste L) de hGH a partir de micropartículas de acordo com a invenção e nanopartículas de PO

Uma comparação da liberação de hGH a partir de nanopartículas de PO (exemplo 2) e micropartículas de PO (exemplo 8) é feita no teste L. A fase contínua é uma solução tamponada de albumina contendo 30 mg/g.

A figura em anexo mostra o tempo necessário para liberar 50% da proteína (hGH) de acordo com as condições de concentração nas quais a formulação é injetável:

- nanopartículas contendo 23 mg/g;
 $t_r = 40 \text{ min}$, isto é, 0,67 h

- micropartículas contendo 73 mg/g;
 $T_r = 973 \text{ min}$, isto é, 16,22 h.

O hGH contido nas micropartículas é liberado 24 vezes mais lentamente do que aquele contido nas nanopartículas.

Exemplo 15: preparação de frascos individuais contendo um pó liofilizado de micropartículas de polímero PO e insulina (100 UI/frasco)

Preparação de 350 g de uma solução de insulina concentrada a 500 UI/g (17,5 mg/g):

6,4 g de insulina humana recombinante (pó) (28,6 UI/g, teor de umidade: 4,5%) são introduzidos em um frasco de vidro. 157 g de água são adicionados e insulina é dispersa com agitação magnética baixa. 46,6 g de HCl 0,1 N são adicionados até se obter uma solução clara de insulina ácida. 69,8 g de carbonato de sódio 0,1 N são, então, adicionados para obter uma solução clara final tendo um pH compreendido entre 7 e 8. A solução é diluída até a concentração desejada por adição de 70,2 g de água.

Mistura com a solução de polímero PO:

326 g da solução de insulina concentrada obtida são lentamente derramados (com agitação magnética) sobre 3426 g de uma solução de polímero PO (concentrado 11 mg/g).

- 5 A mistura é passada através de um filtro de 0,2 μm e deixada com agitação lenta durante a noite. Todas as etapas a seguir são efetuadas sob condições assépticas.

Floculação - lavagem - concentração:

- A formulação anterior é floculada pela adição controlada de 377 g de MgCl_2 2 M (com uma razão r de 7,2).
10 Após curar por 1 h, a suspensão é lavada com água por microfiltração tangencial (Módulo Microza a partir de Pall com uma área superficial específica de 0,32 m^2) até que a osmolaridade seja de aproximadamente 340 mOsm e concentrada
15 a uma concentração de PO de aproximadamente 27 mg/g. O pH é ajustado em 6,5 pela adição de solução de NaOH 1 N (aproximadamente 6 g) na suspensão. Isso fornece uma suspensão que contém aproximadamente 100 UI/g de insulina (o valor exato pode ser obtido por HPLC em uma coluna de
20 sílica enxertada com C18).

Adição de polivinil pirrolidona:

- 200 g de solução de polivinil pirrolidona, concentrada a aproximadamente 40 mg/g são obtidos a partir de um pó de polivinil pirrolidona injetável (por exemplo
25 K17) e são passados através de um filtro de esterilização de 0,2 μm . 120 g da solução filtrada são, então, adicionadas sob condições estéreis a 1200 g da suspensão anterior e a mistura é agitada por aproximadamente 15 min.

- A suspensão obtida contém aproximadamente 91 UI/g
30 de insulina.

Liofilização:

A suspensão anterior é distribuída em frascos individuais com 100 UI por frasco (aproximadamente 1,1 g da

suspensão anterior por frasco): os frascos são liofilizados sob condições estéreis por um ciclo de 72 h. Eles são, então, hermeticamente fechados até serem utilizados.

Exemplo 16: reconstituição dos frascos de micropartículas/insulina obtida no exemplo 15

A suspensão é reconstituída de forma extemporânea (antes do uso) como a seguir:

1 ml de água é introduzido utilizando uma seringa e uma agulha em um frasco contendo 100 UI de insulina obtida no exemplo anterior.

O frasco é manualmente agitado por alguns segundos para obter uma suspensão homogênea (leitosa): a suspensão é retirada na seringa e está pronta para ser injetada com uma agulha 30G, por exemplo.

A suspensão reconstituída contém:

23 mg/ml de polímero PO

100 UI/ml de insulina (3,5 mg/ml)

4 mg/ml de polivinil pirrolidona

0,18 mmol/ml de Mg^{2+} (com $r = 2,8$).

As características da suspensão reconstituída são descritas abaixo:

$r = 2 \times \left[\frac{Mg^{2+}}{COO^-} \right]$ (de acordo com o teste M)	pH	Osmolaridade mOsm	Tamanho D(0,5) μm (de acordo com o teste T1)	d_{ap} (mg/ml) (de acordo com o teste D)
2,8	6,5	300	15,0	0,13

A viscosidade dinâmica medida em 20 °C é igual a 5 mPa.s.

Exemplo 17: farmacocinética de insulina no cão após injeção subcutânea de uma formulação baseada em poliaminoácidos anfifílicos na forma de micropartículas

Dois grupos de 6 cães beagle simples (pesando 10,4 ± 0,6 kg) foram sucessivamente tratados com uma das seguintes formulações durante um experimento de cruzamento com 2 períodos:

Formulação	Número de cães	[insulina] (UI/g)	[PO] (mg/g)	Dose (UI/kg)	Volume de dose (μL/kg)
Lantus® (batelada 40N300)	12	100	0	1	10
Formulação 4	12	100	20	1	10

A referência desse experimento, Lantus®, é um análogo de insulina modificado (insulina glargine) fornecido pela Sanofi-Aventis. A modificação de dois resíduos de aminoácido na estrutura primária da insulina humana dá a Lantus® algumas propriedades de liberação prolongada em um período de 24 h graças a uma precipitação *in situ*.

A formulação 4 é preparada de acordo com o exemplo 16.

A glicemia é determinada por método enzimático (hexoquinase) com um analisador bioquímico automático (Advia 1650, Bayer Diagnostics).

A análise dos resultados farmacocinéticos se baseia na percentagem da glicemia basal como uma função do tempo.

Os dados farmacocinéticos são dispostos na tabela abaixo:

Formulação	$C_{\min} \pm$ SD (%)	$APGC_{0-36h} \pm$ SD (%h)	$APGC_{\text{formulação 4}} /$ $APGC_{\text{Lantus}} \pm$ SD (%)	$T_{50\%APGC} \pm$ SD (h)
Lantus®	40 ± 6	1250 ± 342	-	$13,3 \pm 3,1$
Formulação 4	45 ± 4	1389 ± 309	118 ± 37	$19,7 \pm 3,7$

onde:

$C_{\min}$ é a percentagem mínima da glicemia basal, que foi observada;

$APGC_{0-36h}$ representa a área entre a glicemia basal e a percentagem da glicemia basal como uma função do tempo entre 0 e 36 h pós-dose,

$T_{50\%APGC}$ representa o tempo necessário para obter 50% de $APGC_{0-36h}$.

A administração da referência Lantus® permite uma diminuição rápida da glicemia a partir da primeira hora. A ação hipoglicêmica de insulina glargine é, então, mantida durante um período compreendido entre 18 e 36 h (a glicemia retorna a seu nível basal após 30 h em média).

Comparativamente, a administração de formulação 4 permite também uma rápida diminuição da glicemia a partir da primeira hora. Então, a percentagem da glicemia basal mantém um platô até 36 h em média. $C_{\min}$ obtido com a formulação 4 é significativamente mais elevado do que o valor obtido com a referência Lantus® ($p < 0,005$, teste-t Student emparelhado e unilateral) que poderia permitir reduzir consideravelmente as fases de hipoglicemia severa em pacientes diabéticos.

O tempo de ação da formulação 4 é claramente maior do que o tempo de ação da referência de ação longa Lantus®. Isso é ilustrado por um valor $T_{50\%APGC}$ que é

significativamente mais elevado para a formulação 4 ($p < 0,005$, teste-t Student emparelhado e unilateral). Nenhuma perda de APGC_{0-36h} foi observada para a formulação 4 em comparação com a referência Lantus®.

5 **Exemplo 18: Preparação de pó liofilizado de micropartículas de polímero PO e de interferon α -2b**

Preparação de uma solução contendo 15 mg/g de polímero PO e 0,19 mg/g d' IFN:

10 166 g de uma solução de 16,5 mg/g de polímero PO são introduzidos em um frasco de 500 ml. 2,3 g de uma solução de metionina 0,3 M são adicionados. Uma solução de IFN α -2b congelada (2,4 mg/g concentrado) é descongelada por 1 h a 25 °C e 13 g dessa solução congelada são introduzidos no frasco compreendendo a solução de polímero. A mistura é
15 deixada por 14 h em temperatura ambiente.

A solução é passada através de um filtro de esterilização de 0,2 μ m. Todas as etapas a seguir são efetuadas sob condições assépticas.

Floculação - lavagem - concentração

20 129,5 g da formulação anterior são floculados pela adição controlada de 148,5 g de MgCl₂ 2M (com uma razão r de 7,0). A suspensão é distribuída em 4 frascos (aproximadamente 37 g por frasco) e centrifugada por 15 min a 3000 rpm/min. 30,5 g de sobrenadante são removidos a
25 partir dos frascos tomando cuidado para não tocar no resíduo de centrifugação. Os resíduos são, então, lavados com 17 g de água estéril em cada frasco. Para essa etapa, a osmolaridade é aproximadamente 300 mOsm.

Liofilização:

30 A suspensão anterior é distribuída em bandejas do tipo Lyoguard® (Gore®) permitindo manter estéril a suspensão durante a liofilização: as bandejas são, então,

liofilizadas sob condições estéreis por um ciclo de 72 h com um secador a frio de laboratório (Christ).

Exemplo 19: reconstituição da suspensão de micropartículas contendo interferon α -2b a partir do pó liofilizado obtido no exemplo 18

Para conhecer a quantidade de pó a utilizar para obter exatamente 0,5 mg/g de interferon na formulação, um teste de reconstituição preliminar é feito e o interferon α -2b é ensaiado por HPLC com uma coluna de sílica enxertada-C18.

A suspensão é reconstituída de forma extemporânea (antes de utilizar) como a seguir:

13,58 g de água são adicionados sobre 1,22 g de pó liofilizado e a suspensão é homogeneizada com uma haste magnética por 1 h.

A suspensão obtida é homogênea (leitosa): a suspensão é retirada em uma seringa e está pronta para ser injetada com uma agulha 30G, por exemplo.

A suspensão reconstituída contém:

46 mg/ml de polímero PO

0,5 mg/ml de interferon α -2b

0,34 mmol/ml de Mg^{2+} (com $r = 2,6$).

As características da suspensão reconstituída são descritas abaixo:

$r = 2 \times \left[\frac{Mg^{2+}}{COO^-} \right]$ (de acordo com teste M)	pH	Osmolaridade mOsm
2,6	6,1	705

Exemplo 20: farmacocinética de IFN no cão após injeção subcutânea de uma formulação baseada em poliaminoácidos anfifílicos na forma de micropartículas

Oito cães beagle simples (pesando $9 \pm 0,6$ kg) foram tratados com as seguintes formulações:

Formulação	Número de cães	[IFN] (mg/ml)	[PO] (mg/ml)	pH/mOsm	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	Volume de dose (ml/kg)
IFN IR	4	0,5	0	6,45/354	60	0,12
Formulação 5	4	0,5	46	6,1/705	60	0,12

O IFN IR corresponde a uma solução de interferon humano recombinante (PCGen, batelada IB05.0516 com concentração ajustada, pH e osmolaridade [IFN] = 0,5 mg/ml; pH = 6,45, 354 mOsm).

A formulação 5 é preparada de acordo com o exemplo 19, a partir da mesma batelada de interferon (PCGen).

Os dados farmacocinéticos são dispostos na tabela abaixo:

Formulação	$C_{\max} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	$T > 50 \text{ ng/ml} \pm \text{SD (h)}$	$\text{AUC}_{0-\text{todos}} \pm \text{SD}$ (ng.h/ml)	RBA (%)	$T_{50\% \text{auc}} \pm \text{SD (h)}$
IFN IR	$25,2 \pm 0,4$	$22,6 \pm 0,6$	$162,5 \pm 27,2$	100	$5,1 \pm 0,7$
Formulação 5	$0,9 \pm 0,6$	$219,8 \pm 29,8$	$95,5 \pm 47,5$	> 59	$96,7 \pm 31,7$

onde:

$C_{\max}$ é a concentração máxima de IFN em soro;

$T > 10 \text{ ng/ml}$ é o tempo quando a concentração de IFN em soro é maior do que 50 ng/ml,

AUC representa a área sob a curva de concentração de IFN de soro como uma função do tempo,

RBA representa a biodisponibilidade relativa a uma formulação de liberação imediata,

5 $T_{50\%auc}$ representa o tempo necessário para liberar 50% do IFN total liberado.

O IFN IR tem um perfil de liberação rápida com uma concentração máxima de soro de $25,2 \pm 0,4$ ng/ml atingido após um tempo médio de 5 horas (faixa 3 - 5 h). O
10 IFN em circulação não mais é quantificável além de 24 horas.

A formulação 1 oferece uma grande modificação do perfil farmacocinético do IFN com uma liberação muito lenta, e uma concentração máxima de soro de $0,9 \pm 0,6$ ng/ml
15 (28 vezes mais baixa do que a concentração do IR), atingida após um tempo médio de 108 horas (faixa 66 - 144 h). A tendência geral da farmacocinética é um perfil plano na forma de um pseudoplatô. O nível de IFN em circulação retorna para uma concentração não quantificável entre 168
20 horas e mais de 240 horas (7 e mais de 10 dias).

Essa formulação tem um AUC menor: 41% de perda de biodisponibilidade relativa (RBA = 59%). $T_{50\%auc}$ é aproximadamente 19 vezes maior do que o $T_{50\%auc}$ do IFN-IR.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação farmacêutica líquida para a liberação prolongada de PA que compreende uma suspensão coloidal aquosa de baixa viscosidade com base em partículas micrométricas de polímero (PO),

i. o polímero PO

. sendo um polímero solúvel em água, biodegradável, anfifílico portando grupos hidrofóbicos (GH) e grupos hidrofílicos ionizáveis (GI) que são pelo menos parcialmente ionizados,

. e formando espontaneamente uma suspensão coloidal de nanopartículas em água, em pH = 7,0, sob condições isotônicas,

ii. as partículas sendo capazes de se associar espontaneamente e não covalentemente com pelo menos um princípio ativo (PA), em pH = 7,0, sob condições isotônicas,

caracterizada pelo fato de que as partículas micrométricas de PO têm um tamanho, medido em um teste T, entre 0,5 e 100 μm , preferivelmente entre 1 e 70 μm , preferivelmente entre 2 e 40 μm , e em que contém íons multivalentes tendo uma valência menor ou igual a 4, preferivelmente íons divalentes, íons trivalentes ou misturas dos mesmos, de polaridade oposta àquela dos grupos ionizáveis GI do polímero, os íons multivalentes tendo sido adicionados para fazer com que as nanopartículas de polímero se agreguem em partículas micrométricas em uma quantidade tal que a relação r, medida em um teste M, e definida pela fórmula $r = n \times \left[\frac{MI}{GI} \right]$, onde

- n é a valência dos íons multivalentes,

- [MI] é a concentração molar de íons

multivalentes,

- [GI] é a concentração molar de grupos ionizáveis GI,

está compreendida entre 0,3 e 10, preferivelmente entre 0,6 e 5,0 e particularmente preferivelmente entre 0,8 e 3,0.

2. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que as partículas micrométricas têm uma densidade de polímero aparente d_{app} , medida em um teste D, entre 0,05 e 1,0, preferivelmente entre 0,07 e 0,7 e particularmente preferivelmente entre 0,1 e 0,5.

3. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o tempo de liberação T_r de um dado PA, como medido em um teste L, aumenta em relação ao tempo de liberação t_r de uma formulação injetável idêntica não contendo íons multivalentes, como medido no mesmo teste L, esse aumento sendo tal que T_r é maior ou igual a $1,1 \times t_r$ e preferivelmente tal que T_r é maior ou igual a $1,5 \times t_r$.

4. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos um PA associado às micropartículas de PO.

5. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que sua viscosidade dinâmica a 20 °C, para um gradiente de cisalhamento de 1000 s^{-1} , é menor ou igual a 500 mPa.s e preferivelmente entre 2 e 200 mPa.s.

6. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que os grupos hidrofóbicos (GH) são ligados lateralmente à cadeia.

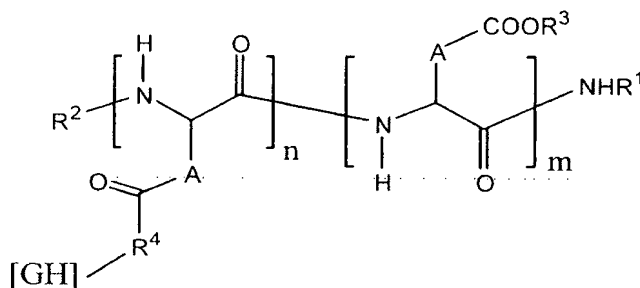
7. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que o

polímero PO é selecionado do grupo que compreende poliaminoácidos, (poli)peptídeos, gelatinas, proteínas, polissacarídeos - preferivelmente selecionados dentre o subgrupo compreendendo pululanos e/ou quitosanas e/ou mucopolissacarídeos - e misturas dos mesmos.

8. Formulação, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o polímero PO hidrofobicamente modificado é selecionado dentre (co)poliaminoácidos.

9. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o polímero (PO) é um poliaminoácido cuja cadeia principal é composta de resíduos aspárticos ou resíduos glutâmicos, pelo menos alguns desses resíduos sendo modificados pelo enxerto de pelo menos um grupo hidrofóbico (GH) na cadeia ou na extremidade da cadeia.

10. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, caracterizada pelo fato de que o polímero PO hidrofobicamente modificado é definido pela fórmula geral (I) abaixo:



na qual:

R^1 é H, uma alquila C2 a C10 linear ou C3 a C10 ramificada, um radical de benzila, um resíduo terminal de aminoácido, ou $-\text{R}^4-\text{[GH]}$;

R^2 é H, um grupo de acila C2 a C10 linear ou C3 a C20 ramificada, um piroglutamato ou $-\text{R}^4-\text{[GH]}$;

R^3 é H ou uma entidade catiônica preferivelmente selecionada do grupo que compreende:

- cátions de metal vantajosamente selecionados dentre o subgrupo que compreende sódio, potássio, cálcio e magnésio,

- cátions orgânicos vantajosamente selecionados dentre o subgrupo compreendendo:

- cátions baseados em amina;
 - cátions baseados em oligoamina,
 - cátions baseados em poliamina (polietilenimina sendo particularmente preferido), e
 - cátions baseados em aminoácido(s) vantajosamente selecionado(s) da classe que compreende cátions baseados em lisina ou arginina,

- e poliaminoácidos catiônicos, vantajosamente selecionados dentre o subgrupo que compreende polilisina e oligolisina;

R^4 é uma ligação direta, ou um "espaçador", baseada em 1 a 4 resíduos de aminoácido;

A é independentemente um radical $-CH_2-$ (resíduo aspártico) ou $-CH_2-CH_2-$ (resíduo glutâmico);

$n/(n + m)$ é definido como a taxa de enxerto molar e seu valor é suficientemente baixo para PO, dissolvido em água em pH = 7 e a 25 °C, para formar uma suspensão coloidal de partículas submicrônicas de PO, $n/(n + m)$ sendo preferivelmente entre 1 e 25% mol e particularmente preferivelmente entre 1 e 15% mol;

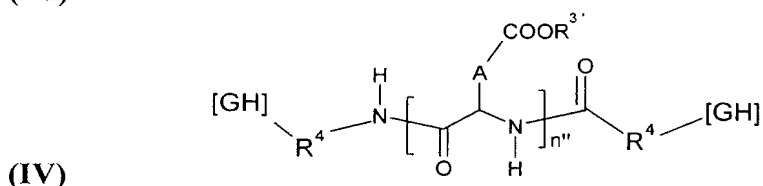
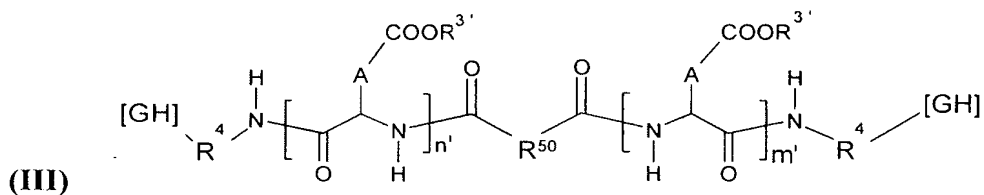
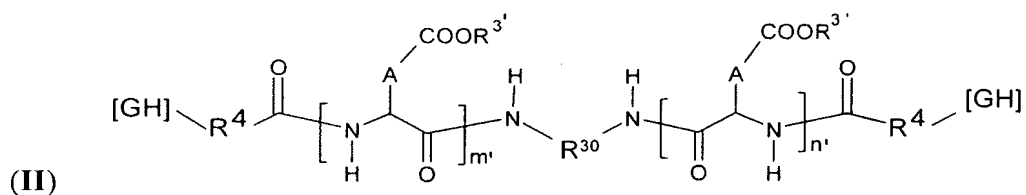
$n + m$ varia de 10 a 1000 e preferivelmente entre 50 e 300; e

GH é um grupo hidrofóbico.

11. Formulação, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que o grupo hidrofóbico GH é derivado de um precursor de álcool selecionado do grupo que

compreende octanol, dodecanol, tetradecanol, hexadecanol, octadecanol, álcool de oleíla, tocoferol e colesterol, e em que R^4 é uma ligação direta.

12. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, **caracterizada** pelo fato de que o PO tem uma das fórmulas gerais (II), (III) e (IV) abaixo:



em que:

GH é um grupo hidrofóbico;

10 R^{30} é um grupo de alquila C2 a C6 linear;

$R^{3'}$ é H ou uma entidade catiônica preferivelmente selecionada dentre o grupo que compreende:

15 - cátions de metal vantajosamente selecionados dentre o subgrupo que compreende sódio, potássio, cálcio e magnésio,

- cátions orgânicos vantajosamente selecionados dentre o subgrupo compreendendo:

20 - cátions baseados em amina;
- cátions baseados em oligoamina,
- cátions baseados em poliamina (polietilenimina sendo particularmente preferido), e

- cátions baseados em aminoácido(s) vantajosamente selecionado(s) dentre a classe que compreende cátions baseados em lisina ou arginina,

- e poliaminoácidos catiônicos, 5 vantajosamente selecionados dentre o subgrupo que compreende polilisina e oligolisina;

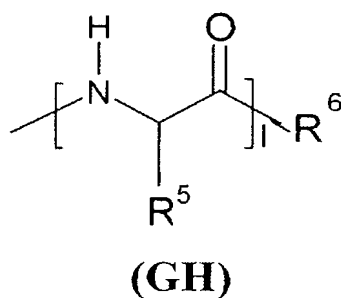
R^{50} é um grupo de alquila C2 a C6, dialcóxi ou diamina;

R^4 é uma ligação direta, ou um "espaçador", 10 baseada em 1 a 4 resíduos de aminoácido;

A é independentemente um radical $-\text{CH}_2-$ (resíduo aspártico) ou $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (resíduo glutâmico); e

($n' + m'$) ou n'' são definidos como o grau de polimerização e variam de 10 a 1000 e preferivelmente entre 15 50 e 300.

13. Formulação, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que os n grupos GH do PO cada um, independentemente entre si, é um radical monovalente da fórmula abaixo:



20

na qual:

R^5 é um radical de metila (alanina), isopropila (valina), isobutila (leucina), sec-butila (isoleucina) ou benzila (fenilalanina);

25 R^6 é um radical hidrofóbico contendo 6 a 30 átomos de carbono; e

l varia de 0 a 6.

14. Formulação, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada** pelo fato de que todos ou alguns dos grupos hidrofóbicos R⁶ do PO são independentemente selecionados do grupo de radicais compreendendo:

5 um alcóxi linear ou ramificado contendo 6 a 30 átomos de carbono e capaz de conter pelo menos um heteroátomo (preferivelmente O, N ou S) ou pelo menos uma unidade de insaturação,

 um alcóxi contendo 6 a 30 átomos de carbono,
10 tendo um ou mais anéis carbocíclicos fundidos e opcionalmente contendo pelo menos uma unidade de insaturação e/ou pelo menos um heteroátomo (preferivelmente O, N ou S), e

 um alcóxi arila ou um arilóxi alquila tendo 7 a
15 30 átomos de carbono e capaz de conter pelo menos uma unidade de insaturação ou pelo menos um heteroátomo (preferivelmente O, N ou S).

15. Formulação, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, **caracterizada** pelo fato de que o radical hidrofóbico
20 R⁶ do enxerto do PO é derivado de um precursor de álcool selecionado dentre o grupo que compreende octanol, dodecanol, tetradecanol, hexadecanol, octadecanol, álcool de oleíla, tocoferol e colesterol.

16. Formulação, de acordo com a reivindicação 9,
25 **caracterizada** pelo fato de que a cadeia principal do poliaminoácido é um homopolímero alfa-L-glutamato ou alfa-L-glutâmico.

17. Formulação, de acordo com a reivindicação 9,
30 **caracterizada** pelo fato de que a cadeia principal do poliaminoácido é um homopolímero alfa-L-aspartato ou alfa-L-aspartico.

18. Formulação, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada** pelo fato de que a cadeia principal do

poliaminoácido é um copolímero de alfa-L-aspartato/alfa-L-glutamato ou alfa-L-aspartico/alfa-L-glutâmico.

19. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o peso molecular do PO está
5 entre 2.000 e 100.000 g/mol e preferivelmente entre 5.000 e 40.000 g/mol.

20. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o PO tem grupos aniônicos GI e que os íons multivalentes são cátions multivalentes,
10 preferivelmente cátions divalentes e particularmente preferivelmente selecionados dentre o grupo que compreende Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} e misturas dos mesmos, ou cátions trivalentes selecionados mais particularmente preferivelmente do grupo que compreende Al^{3+} , Fe^{3+} e
15 misturas dos mesmos.

21. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que compreende pelo menos um estabilizador selecionado dentre o grupo que compreende:

20 nanopartículas de pelo menos um polímero PO, o PO sendo um copolímero solúvel em água, biodegradável, anfifílico contendo grupos hidrofóbicos (GH) e grupos hidrofílicos ionizáveis (GI) que são pelo menos parcialmente ionizados, e espontaneamente formando uma
25 suspensão coloidal de nanopartículas em água, em pH = 7,0 sob condições isotônicas;

polialquileno glicóis, preferivelmente polietileno glicóis;

30 copolialquileno glicóis, preferivelmente copolímeros de etileno glicol/propileno glicol (do poloxâmero, tipo Pluronic ou Lutrol);

polímeros de celulose e derivados dos mesmos, preferivelmente carbóxi alquila celulosas (por exemplo,

carbóxi metil celulosas) ou alquil celulosas (por exemplo, metil celulosas);

ésteres de sorbitano e um ou mais ácidos graxos, preferivelmente ésteres de polioxialquilenos (por exemplo, polioxietileno) glicol e pelo menos um ácido (por exemplo, ácido oléico), do tipo Tween ou polysorbate;

tensoativos baseados em fosfolipídios e polialquilenos glicólicos, preferivelmente polietileno glicólicos; sacarídeos hidrogenados ou não hidrogenados, tais como trealose, sorbitol, manitol ou sacarose;

polióis, tais como propileno glicol ou glicerol; gelatinas, preferivelmente gelatinas hidrolisadas;

(co)polímeros contendo nitrogênio, preferivelmente do grupo que compreende poliacrilamidas, poli-N-vinil amidas, polivinil pirrolidonas (PVP) e poli-N-vinil lactamas;

álcoois de polivinil (PVA); e misturas dos mesmos.

22. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o PA é selecionado do grupo que compreende proteínas, glicoproteínas, proteínas ligadas a uma ou mais cadeias de polialquilenos glicol [preferivelmente cadeias de polietileno glicol (PEG): "Proteínas PEGuiladas"], peptídeos, polissacarídeos, lipossacarídeos, oligonucleotídeos, polinucleotídeos e misturas dos mesmos, e particularmente preferivelmente a partir do subgrupo que compreende eritropoietina, oxitocina, vasopressina, hormônio adrenocorticotrófico, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fatores estimulantes de hemopoiese e misturas dos mesmos, fatores VIII e IX, hemoglobina, citocromos, prolactina, albuminas, hormônio de

liberação de hormônio luteinizante (LHRH), antagonistas de LHRH, competidores de LHRH, hormônios de crescimento bovino, de porco ou humano (GH), fator de liberação de hormônio de crescimento, insulina, somatostatina, glucagon, interleucinas ou misturas dos mesmos (IL-2, IL-1 l, Il-12), α -, β - ou γ -interferon, gastrina, tetragastrina, pentagarstrina, urogastrona, secretina, calcitonina, encefalina, endomorfina, angiotensinas, hormônio de liberação de tirotropina (TRH), fator de necrose de tumor (TNF), fator de crescimento de nervo (NGF), fator de estimulação de colônia de granulócito (G-CSF), fator de estimulação de colônia de macrófago de granulócito (GM-CSF), fator de estimulação de colônia de macrófago (M-CSF), heparinase, proteína morfogenética de osso (BMP), peptídeo natriurético auricular humano (hANP), peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), VEG-F, antígeno de superfície de hepatite B recombinante (rHBsAg), renina, citocinas, bradicinina, bacitracinas, polimixinas, colistinas, tirocidina, gramicidinas, ciclosporinas e análogos sintéticos e modificações farmacologicamente ativas e fragmentos de enzimas, citocinas, anticorpos, antígenos e vacinas.

23. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o PA é uma molécula orgânica hidrofóbica, hidrofílica ou anfifílica "pequena".

24. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o princípio ativo é selecionado de pelo menos uma das seguintes famílias de substâncias ativas: agentes para tratar abuso de álcool, agentes para tratar doença de Alzheimer, anestésicos, agentes para tratar acromegalia, analgésicos, antiasmáticos, agentes para tratar alergias,

agentes anticâncer, anti-inflamatórios, anticoagulantes e
 antitrombóticos, anticonvulsivantes, antiepiléticos,
 antidiabéticos, antieméticos, antiglaucomas, anti-
 histaminas, antiinfeciosos, antibióticos, antifúngicos,
 5 antivirais, antiparkinsonianos, anticolinérgicos,
 antitussivos, inibidores de anidrase carbônica, agentes
 cardiovasculares, hipolipêmicos, antiarrítmicos,
 vasodilatadores, antianginais, anti-hipertensivos,
 vasoprotetores, inibidores de colinesterase, agentes para
 10 tratar distúrbios de sistema nervoso central, estimulantes
 do sistema nervoso central, contraceptivos, promotores de
 fertilidade, indutores e inibidores de parto, agentes para
 tratar mucoviscidose, agonistas receptores de dopamina,
 agentes para tratar endometriose, agentes para tratar
 15 disfunções eréteis, agentes para tratar fertilidade,
 agentes para tratamento de distúrbios gastrointestinais,
 imunomoduladores e imunossupressores, agentes para tratar
 distúrbios de memória, antienxaquecas, relaxantes
 musculares, análogos de nucleosídeo, agentes para tratar
 20 osteoporose, parassimpaticomiméticos, prostaglandinas,
 agentes psicoterapêuticos, sedativos, hipnóticos e
 tranqüilizantes, neurolépticos, ansiolíticos,
 psicoestimulantes, antidepressantes, agentes para tratar
 distúrbios dermatológicos, esteróides e hormônios,
 25 anfetaminas, anoréticos, lenitivos não analgésicos,
 antiepiléticos, barbitúricos, benzodiazepinas, hipnóticos,
 laxativos, psicotrópicos e quaisquer associações desses
 produtos.

25. Formulação, de acordo com qualquer uma das
 30 reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que
 sua fração de peso de PA não associada às partículas
 micrométricas [PA não associado] em % é tal que:

$$[\text{PA não associado}] \leq 1,$$

preferivelmente, [PA não associado] $\leq 0,5$.

26. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que o PA é o hormônio de crescimento humano recombinante hGH.

5 27. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizada** pelo fato de que o PA é insulina.

28. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizada** pelo fato de que o PA
10 é interferon α -2b.

29. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** pelo fato de que é destinada à preparação de drogas, particularmente para administração por via parenteral, mucosa, subcutânea,
15 intramuscular, intradérmica, intraperitoneal ou intracerebral ou intratumoral, ou pela via oral, nasal, pulmonar, vaginal ou ocular.

30. Processo para a preparação da formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores,
20 **caracterizado** pelo fato de consistir essencialmente em:

a. tomar ou preparar uma suspensão coloidal de nanopartículas de pelo menos um PO,

b. opcionalmente, misturar essa suspensão coloidal de nanopartículas de PO com pelo menos um PA,
25 preferivelmente em solução aquosa,

c. opcionalmente, filtrar a suspensão resultante,

d. adicionar íons multivalentes (preferivelmente na forma de sais) de polaridade oposta àquela dos grupos GI do polímero PO, os íons multivalentes sendo adicionados em
30 uma quantidade de tal modo que a razão r,

definida pela fórmula $r = n \times \left[\frac{MI}{GI} \right]$, onde

- n é a valência dos íons multivalentes,

- [MI] é a concentração molar de íons multivalentes,

5 - [GI] é a concentração molar de grupos ionizáveis GI,

está entre 0,3 e 10, preferivelmente entre 0,6 e 5,0 e particularmente preferivelmente entre 0,8 e 3,0, e

10 e. se necessário, ajustar o pH ou a osmolaridade.

31. Processo, de acordo com a reivindicação 30, **caracterizado** pelo fato de que o PA está na forma de uma solução ou suspensão aquosa para mistura com a suspensão coloidal de nanopartículas ou micropartículas de PO.

15 32. Processo para a preparação de um produto derivado a partir da formulação conforme qualquer uma das reivindicações 1 a 29, ou a partir da formulação obtida pelo processo conforme a reivindicação 30, **caracterizado** pelo fato de consistir essencialmente em secar a suspensão
20 de partículas micrométricas para fornecer uma forma sólida, preferivelmente um pó de partículas micrométricas, o qual pode ser armazenado ou administrado.

33. Processo para a preparação da formulação conforme qualquer uma das reivindicações 1 a 29,
25 **caracterizado** pelo fato de consistir essencialmente em:

. tomar pelo menos um produto derivado (carregado ou não carregado com o PA) obtido pelo processo conforme a reivindicação 32,

. e misturar esse produto derivado com água ou
30 uma solução aquosa S de reconstituição.

34. Produto derivado a partir da formulação conforme qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **caracterizado** pelo fato de que está em forma não líquida e

em que compreende partículas micrométricas de polímero (PO),

i. o polímero PO

sendo um polímero solúvel em água,
5 biodegradável, anfifílico contendo grupos hidrofóbicos (GH) e grupos hidrofílicos ionizáveis (GI),

e formando espontaneamente uma suspensão coloidal de nanopartículas em água, em pH = 7,0, sob condições isotônicas,

10 ii. as partículas sendo capazes de se associar espontânea e não covalentemente com pelo menos um princípio ativo (PA), em pH = 7,0, sob condições isotônicas,

essas partículas micrométricas de PO tendo um tamanho, medido em um teste T, entre 0,5 e 100 μm ,
15 preferivelmente entre 1 e 70 μm , e particularmente preferivelmente entre 2 e 40 μm ;

e em que o produto contém derivados de íons multivalentes, preferivelmente íons divalentes, de polaridade oposta àquela do grupo GI do polímero, a razão
20 r,

definida pela fórmula $r = n \times \left[\frac{MI}{GI} \right]$, onde

- n é a valência dos íons multivalentes,

- [MI] é a concentração molar de
25 íons multivalentes,

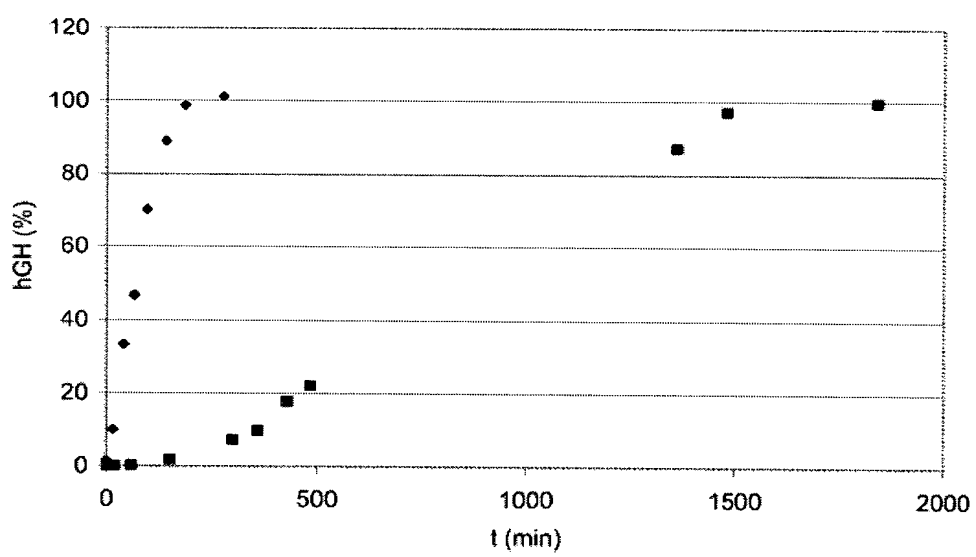
- [GI] é a concentração molar de grupos ionizáveis GI,

está entre 0,3 e 10, preferivelmente entre 0,6 e 5,0, e particularmente preferivelmente entre 0,8 e
30 3,0.

35. Produto derivado, de acordo com a

reivindicação 34, caracterizado por consistir, por exemplo, em um pó ou um gel.

36. Processo para a preparação de drogas, particularmente para administração pela via parenteral, mucosa, subcutânea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal ou intracerebral ou em um tumor, ou pela via oral, nasal, pulmonar, vaginal ou ocular, caracterizado pelo fato de consistir essencialmente em utilizar pelo menos uma formulação conforme qualquer uma das reivindicações 1 a 29, e/ou uma formulação obtida pelo processo conforme qualquer uma das reivindicações 30 a 32, e/ou qualquer produto derivado a partir da formulação, e/ou qualquer precursor da formulação.

**FIGURA**

RESUMO

FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS PARA A LIBERAÇÃO PROLONGADA DE PRINCÍPIO(S) ATIVO(S), BEM COMO SUAS APLICAÇÕES, ESPECIALMENTE APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

5 A presente invenção refere-se a formulações farmacêuticas novas com base em suspensões coloidais aquosas para a liberação prolongada de princípio(s) ativo(s) - PA - particularmente proteína(s) e peptídeo(s), bem como as aplicações, especialmente aplicações terapêuticas, dessas formulações. Essa formulação compreende uma suspensão coloidal aquosa de baixa viscosidade baseada em partículas micrométricas de um polímero PO solúvel em água, biodegradável, anfifílico contendo grupos hidrofóbicos (GH) - alfa-tocoferol - e
10 grupos hidrofílicos ionizáveis (GI) - Glu - que são pelo menos parcialmente ionizados, as partículas sendo capazes de se associar espontânea e não covalentemente com um PA, em pH = 7,0, sob condições isotônicas, e tendo um tamanho entre 0,5 e 100 µm. Essa suspensão contém íons
15 multivalentes (MG⁺⁺) de polaridade oposta àquela do grupo GI do PO, a razão r, definida pela fórmula (A)

$$r = n \times \left[\frac{MI}{GI} \right] \quad (A)$$

onde

- n é a valência dos íons multivalentes,
- 25 - [MI] é a concentração molar de íons multivalentes,
- [GI] é a concentração molar de grupos ionizáveis GI,
- estando entre 0,3 e 10.