



INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação*: PT 814778 E

(51) *Classificação Internacional*: (Ed. 6 )  
A61K009/16 A A61K009/50 B

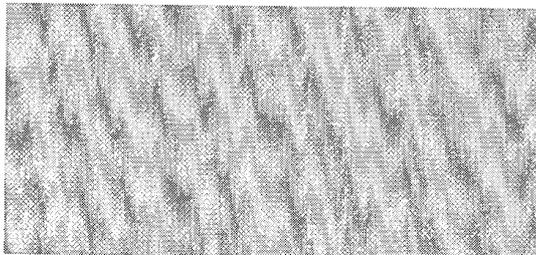
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

<b>(22) Data de depósito:</b> 1996.03.07	<b>(73) Titular(es):</b> ROCHE DIAGNOSTICS GMBH - D-68298 MANNHEIM DE
<b>(30) Prioridade:</b> 1995.03.10 DE 19508612 1995.04.11 DE 19513659 1995.11.17 DE 19542837	<b>(72) Inventor(es):</b> GERHARD WINTER HANS KOLL THOMAS KINSSEL MICHAEL MORLOCK DE DE DE DE
<b>(43) Data de publicação do pedido:</b> 1998.01.07	<b>(74) Mandatário(s):</b> JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT
<b>(45) Data e BPI da concessão:</b> 2001.06.15	

**(54) Epígrafe:** FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO FARMACÊUTICAS CONTENDO POLIPÉPTIDOS SOB A FORMA DE MICROPARTÍCULAS E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO

**(57) Resumo:**

FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO FARMACÊUTICAS CONTENDO POLIPÉPTIDOS SOB A FORMA DE MICROPARTÍCULAS E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO



ZSS

### Descrição

#### **“Formas de administração farmacêuticas contendo polipéptidos sob a forma de micropartículas e processo para a sua preparação”**

São objecto da presente invenção formas de administração farmacêuticas parentéricas com a forma de micropartículas (MP) para a libertação controlada de polipéptidos e processo para a preparação destas micropartículas.

Devido ao rápido avanço do desenvolvimento da biotecnologia, está hoje em dia à disposição um grande número de macromoléculas bioactivas em quantidade suficiente para a utilização clínica. Exigido pela sua estrutura, elas decompõe-se hidroliticamente no tracto estômago-intestinos e podem portanto apenas ser administradas por via parentérica. Por causa dos curtos valores dos seus tempos de semitransformação o desenvolvimento de sistemas de depósito parentéricos é conveniente para reduzir a frequência das injeções e atingir um valor constante do teor no sangue.

Na literatura técnica e de patentes descreve-se uma série de sistemas de depósito, especialmente sistemas de micropartículas para se libertarem as substâncias fisiologicamente activas de maneira mais possível constante depois da administração parentérica durante um mais longo intervalo de tempo. Neste caso, é de assinalar que as proteínas em comparação com as substâncias de baixo peso molecular por causa da sua estrutura complexa, do seu elevado peso molecular e do pequeno grau de cargas eléctricas necessária – exigido para a sua elevada actividade biológica – apresentam algumas particularidades que dificultam um microencapsulamento feito com êxito. Assim, de acordo com o tipo do método de microencapsulamento utilizado, a estabilidade das proteínas pode ser influenciada

ZSS

negativamente e a libertação não se realizar de maneira óptima ou se realizar com um perfil de libertação insatisfatório. O comportamento de libertação é influenciado, por um lado, pelo elevado peso molecular e pela estrutura hidrófila mas também, por outro lado, por problemas de estabilidade (entre outros, agregação) da proteína e do pequeno grau de carregamento.

Um dos métodos de preparação mais importantes para as micropartículas, por exemplo, microcápsulas ou microesferas é o assim chamado “processo de emulsão tripla” que também encontrou utilização para a microencapsulagem de proteínas. Fundamentalmente neste método também designado como técnica W/O/W (água em óleo em água) a substância activa é dissolvida ou suspensa numa solução aquosa e esta solução aquosa é homogeneizada com uma “solução oleosa” que contém o polímero a partir de um dissolvente orgânico não miscível com água de maneira a obter-se uma emulsão W/O (água/óleo). Esta emulsão W/O (água/óleo) é dispersa numa solução aquosa que contém estabilizador (fase aquosa exterior) de modo que se obtém uma emulsão com três fases (emulsão tripla). Por meio de diferentes técnicas consegue-se então a vaporização do dissolvente e, por consequência, um endurecimento das micropartículas. As micropartículas endurecidas são colectadas por centrifugação e/ou filtração e, depois da lavagem com água ou com soluções aquosas apropriadas e são secas por liofilização ou por secagem em vácuo à temperatura ambiente. Como polímeros são em geral utilizados polímeros de ácido láctico (LA = ácido láctico) e ácido glicólico (GA = ácido glicólico) ou os seus copolímeros (PLGA) com pesos moleculares compreendidos entre 2 000 e 100 000 e com uma proporção de ácido láctico : ácido glicólico compreendida entre 100:0 e 50:50.

ZS

Na utilização do processo de emulsão tripla pode aparecer o problema do teor residual do dissolvente nas micropartículas (R.Jalil e J.R. Nixon, J. Microencapsulation 7 (3), 1990, pág. 297-325), porque como dissolvente do polímero se utiliza na maior parte das vezes diclorometano perigoso do ponto de vista toxicológico. Mas também por causa de uma possível influência das propriedades do polímero e da estabilidade da substância activa da matriz do polímero, o teor residual do dissolvente deve ser o mais possível pequeno.

A preparação de microcápsulas com o auxílio do processo de emulsão tripla é divulgado por exemplo no pedido de patente europeia EP 0 145 240 (Takeda) em que a fase aquosa interna possui uma viscosidade de pelo menos 5 000 mPas ou é completamente sólida. O aumento da viscosidade realiza-se com substâncias auxiliares como gelatina, albumina de soro humano, globulina, caseína, colagénio e poliaminoácidos. Nos exemplos de utilização, descreve-se a microencapsulagem de  $\gamma$ -interferon e de heparina.

Na memória descritiva da patente EP 0 190 833 (Takeda) descreve-se o mesmo processo de preparação; no entanto, neste caso a viscosidade da emulsão W/O (água em óleo) é regulada para um valor compreendido entre 150 – 10 000 mPas. Isto realiza-se por variação da concentração do polímero (PLGA 100/0 – 50/50) e adição de compostos de elevado peso molecular, como por exemplo proteínas, hidratos de carbono (celulose, dextrina, pectina, amido, agar), compostos polivinílicos, ácidos policarboxílicos ou compostos de polietileno na fase aquosa. Desta forma, deve conseguir-se uma tendência para a agregação e coesão fortemente atenuada das microcápsulas durante a preparação. Num exemplo de utilização encapsula-se interferon alfa.

ZSS

Em EP 0 442 671 (Takeda), fazem-se especificações ligações semelhantes às efectuadas em EP 0 190 833 relativamente ao comportamento de agregação, forma esférica das micropastículas e possíveis adições. “Substâncias que contêm fármacos” não são absolutamente necessárias de acordo com a descrição da patente. Os exemplos mais pormenorizadamente esclarecidos e concretos na descrição referem-se ao péptido TAP144 de cadeia curta e relativamente estável que representa um analogão de LHRH.

Também na literatura técnica são publicados exemplos para a microencapsulagem de péptidos ou de proteínas com o auxílio da técnica W/O/W (água em óleo e em água).

Assim, Ogawa et al., (Chem- Pharm. Bull. 1988, Vol. 36, N.º 3, pág. 1095-1103) descrevem a microencapsulagem de acetato de leuprorelina, um péptido com utilização de PLA (polímero de ácido láctico) ou de PLGA e pormenorizam também o comportamento de libertação do péptido.

Cohen et al., (Pharmaceutical Research 1991, Vol. 8, N.º 6, pág. 713) encapsularam peroxidase de rábano FITC e FITC-BSA em micropartículas de PLGA com um peso molecular de 14 000 ou menor e uma proporção de ácido láctico/ácido glicólico de 75/25 e descobriram não só o modo de obter intacta a proteína BSA como também uma conservação da actividade da enzima. Jeffery H. et al. (Pharmaceutical Research 1993, Vol. 10, N.º 3, pág. 362) utilizaram ovalbumina como material do núcleo e puderam demonstrar a salvaguarda da proteína libertada. M. S. Hora et al., (Biotechnology 1990, Vol. 8, pág. 755) utilizaram interleucina-2 e as suas formas modificadas como material do núcleo e investigaram o

258

comportamento de libertação de micropartículas de PLGA que continham albumina do soro humano como excipiente.

Em diferentes publicações foram ainda investigados mais pormenorizadamente processos para a preparação de micropartículas à base dos polímeros de PLA e de PLGA com o auxílio de substâncias modelo para diferentes proteínas e a influência dos aditivos sobre a estabilidade das proteínas (vide W. Lu e G. Park, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 1995, 49: 13-19; M.-K. Yeh et al., *Journal of Controlled Release*, 1995, 33: 437-445; M. J. Alonso et al., *Vaccine*, 1995, 12: 299-306; J. P. McGee et al., *Journal of Controlled Release*, 1995, 34: 77-86). Como proteínas modelo investigaram-se neste caso ovalbumina, toxóide de tétano e carbo-anidrase.

Youxin L. et al. (*Journal of Controlled Release* 32, (1994) 121-128) descrevem formas de depósito de copolímeros de tribloco ABA (peso molecular: 15 000 - 40 000), cujo bloco A é um copolímero de ácido láctico e glicólico e cujo bloco B é uma cadeia de polietilenoglicol (PGE). Eles verificaram que estas micropartículas que foram utilizadas para a agregação de albumina de soro bovino relativamente insensíveis que foram utilizadas como proteína modelo com elevado grau de carga (cerca de 3-4% p/p), se libertaram rápida e continuamente durante 2-3 semanas (composição do polímero LA:GA:PEG=48:14:38 [% molar]).

Os polímeros de PLGA até agora frequentemente utilizados no estado da técnica para a preparação de microcápsulas possuem, por causa do seu carácter hidrófobo, como inconveniente mais importante uma ligeira inchabilidade, por meio do que a entrada de água para o interior da forma de depósito só se pode realizar lentamente. Desta forma, é apenas dificilmente possível uma difusão das moléculas

de proteína através das camadas de polímero, o que tem como consequência uma velocidade de libertação insuficiente. Isto é especialmente o caso da inclusão de quantidades muito pequenas de polipéptido, isto é no caso de um pequeno grau de carregamento nas micropartículas. Além disso, a lenta absorção de água, por causa da pequena quantidade de água disponível, realiza uma concentração de proteína local elevada, pelo que é necessária a formação de agregados de proteína de elevado peso molecular. Estes não podem libertar-se por causa do seu elevado peso molecular. Não se pode garantir então um doseamento terapêuticamente digno de confiança da substância activa. Provocadas pela elevada proporção dos agregados de proteína podem-se verificar ainda reacções imunológicas não pretendidas. Só proteínas muito estáveis com relativamente elevados graus de carga de por exemplo mais do que 5% podem ser libertadas com velocidades aceitáveis e sem a formação de agregados durante um logo intervalo de tempo.

Verificou-se ainda que também copolímeros de tribloco ABA hidrófilos não podem então garantir uma libertação contínua de polipéptidos durante um intervalo de tempo de duas semanas, se o teor de polipéptidos nas micropartículas for muito pequeno, isto é se o grau de carga for pequeno. Um grau de carga pequeno verifica-se então se apenas pequenas quantidades de polipéptidos forem encerradas no polímero. Verifica-se um comportamento posterior de agregação semelhante no caso de se utilizarem polipéptidos sensíveis à agregação. Nestes casos, consegue-se também uma formação reforçada de agregados e intervalos de tempo de libertação inaceitáveis menores do que duas semanas com o copolímero de tribloco ABA. Isto origina globalmente velocidades de libertação insuficientes da substâncias activa a partir do polímero.

O objectivo da invenção foi preparar micropartículas que contêm polipéptido em que a agregação da substância activa também se mantém o mais possível pequena para polipéptidos sensíveis à agregação ou se tem de evitar preponderantemente e o polipéptido é contido nas micropartículas sob uma forma o mais possível intacta. As micropartículas devem garantir uma libertação contínua dos polipéptidos durante um intervalo de tempo de pelo menos duas semanas. Isto deve sobretudo conseguir-se em micropartículas que possuem um pequeno grau de carregamento de substância activa. Especialmente, esses intervalos de tempo de libertação devem verificar-se para quantidades pequenas de polipéptidos de até aproximadamente 3% (em relação à quantidade total de micropartículas)

Além disso foi também objectivo da presente invenção proporcionar um processo de microencapsulagem com o qual se podem preparar as micropartículas pretendidas e se garante um teor residual de dissolvente toxicologicamente aceitável nas micropartículas.

O objectivo da invenção é atingido por meio de micropartículas que consistem numa matriz polimérica biodegradável em que o polipéptido é incorporado, em que como polímero se utiliza um copolímero de tribloco ABA, cujo bloco A é um copolímero de ácido láctico e de ácido glicólico e cujo bloco B representa uma cadeia de polietilenoglicol e que contém aditivos que são escolhidos do grupo formado por proteínas de soro, poliaminoácidos, ciclodextrinas; derivados de ciclodextrinas; sacáridos, como por exemplo dissacáridos e polissacáridos, aminoaçúcares, aminoácidos; detergentes; ácidos carboxílicos orgânicos assim como misturas destes aditivos.

ZSS

Como sacáridos interessam por exemplo os dissacáridos tre-halose, sacarose, maltose. Os polissacáridos são por exemplo rafinose, amido, maltodextrina, alginatos ou dextrano. Um aminoaçúcar apropriado é por exemplo é o quitosano. Um derivado de ciclodextrina preferido de acordo com a invenção é por exemplo a beta-hidroxiopropil-ciclodextrina (HPCD). Como proteínas do soro interessam especialmente albumina de soro humano e albumina de soro bovino.

Como ácido carboxílicos orgânicos interessam ácidos monocarboxílicos alifáticos e cíclicos, por exemplo ácido benzóico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido acrílico, ácido crotonico, assim como os seus derivados substituídos por grupos hidroxi como por exemplo ácido p-hidroxibenzóico, ácido  $\beta$ -hidroxibutírico, ácido salicílico, ácido láctico ou ácido glicólico. É especialmente apropriado ácido benzóico. No âmbito da preparação das micropartículas os ácidos orgânicos, são adicionados essencialmente à fase orgânica (fase polimérica), em que se dissolve ou suspende o polímero. A quantidade de ácido carboxílico adicionada varia dentro do intervalo de até 30% em peso, relativamente à quantidade de micropartículas prontas, de preferência até 20% em peso, especialmente 1-15% em peso. A utilização de ácidos monocarboxílicos, como por exemplo ácido benzóico, como aditivo, provoca surpreendentemente uma melhoria da libertação dos polipéptidos a partir das micropartículas. Uma degradação do polímero mais acelerada a esperar por adição de ácidos carboxílicos não foi detectada no caso dos copolímeros de tribloco ABA.

No sentido da invenção são também vantajosas misturas dos aditivos mencionados antes. A título de exemplo, podem-se mencionar misturas de dextranos e poliaminoácidos. Assim, por exemplo são especialmente vantajosas misturas de

ZS

dextrano e poli-L-argina ou dextrano e poli-L-histidina em relação à diminuição da formação de agregados do polipéptido nas micropartículas. Como aditivos preferem-se também misturas de ciclodextrinas ou de derivados de ciclodextrinas com aminoácidos ou poliaminoácidos. Também são apropriados no sentido da utilização na presente invenção detergentes e triglicéridos, como por exemplo Tween 20®, Tween 80®, Pluronic® ou Miglyol®.

Como poliaminoácidos interessam não só os correspondentes isómeros (D) ou (L) mas também poli-(D,L)-aminoácidos. É especialmente preferida poliarginina com um peso molecular de 5 000 – 150 000, em especial 5 000 a 50 000, assim como poli-histidina com um peso molecular de 5 000 – 50 000, em especial 15 000 – 50 000.

Com as mencionadas adições de acordo com a presente invenção é possível descer a proporção de agregado total do polipéptido para um valor inferior a 5%.

No sentido da presente invenção, como polipéptidos interessam polipéptidos fisiologicamente activos com um peso molecular compreendido entre 2 000 e 200 000 D. De preferência o peso molecular monta pelo menos a 5 000, 10 000 ou 20 000 D. Interessam especialmente polipéptidos com um peso molecular de até 100 000, preferivelmente até 50 000 Dalton. Esses polipéptidos são especialmente macromoléculas biologicamente activas, as suas muteínas, análogos, assim como variantes de eliminação ou de substituição que podem ser utilizados para fins terapêuticos. Mencionam-se a título de exemplo os seguintes polipéptidos: eritropoietina (EPO), parathormona (PTH), G-CSF, TNF, NGF ou EGF, assim como os seus derivados deriváveis por eliminações ou substituição na cadeia de aminoácidos. Outros polipéptidos são: interferons ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -interferon), factores de

ZSS

estimulação de colónias, interleucinas, factores que activam macrófagos, factores de células B, factores de células T, imunotoxinas, linfotoxiinas, TGF, trombopoietina (TPO), inibidores de renina, inibidores de colagenase, EGF, hormonas de crescimento, PDGF, factores de crescimento de tecido ósseo, BMP (proteínas morfogénicas de tecido ósseo), insulina, IGF-BP (proteínas de ligação de factor de crescimento semelhantes a insulina), ANP (péptidos natriuréticos atriais), calcitonina, FSH, LH, NGF, glucagona, TSH (hormona de estimulação da tiróide), anticorpos monoclonais ou policlonais. No sentido de utilização de acordo com a presente invenção são polipéptidos especialmente apropriados os polipéptidos sensíveis à agregação como por exemplo EPO.

O teor de polipéptidos nas micropartículas monta a valores compreendidos entre 0,01 e 5% em peso, com base na quantidade total de micropartículas. Preferivelmente, o grau de carregamento monta a 0,1 – 3% em peso, especialmente 0,1 – 2% em peso e de preferência 0,1 – 1% em peso. Especialmente podem-se preparar micropartículas com um grau de carregamento muito pequeno de até 1% em peso. Para proteínas sensíveis à agregação, o grau de carregamento preferido monta a 0,1 – 1%, em especial 0,2 – 0,6%. Como limites inferiores interessa um grau de carregamento de cerca de 0,01; 0,05 ou respectivamente 0,1% em peso. A quantidade da substância activa contida nas micropartículas depende em cada caso individual da dosagem pretendida e da largura terapêutica da respectiva substância activa. No caso de EPO, a quantidade de substância activa monta a aproximadamente 10 µg – 100 µg por 10 mg de quantidade de micropartículas. Especialmente, utilizam-se cerca de 10 – 70 µg, preferivelmente 30 – 50 µg. Para uma actividade específica de EPO de cerca 160 000 U/mg, isto corresponde a uma

ZSS

dosagem de 1 600 – 16 000 U por 10 mg de quantidade de micropartículas (10 – 100 µg por 10 mg de quantidade de micropartículas). Prefere-se fixar a quantidade de micropartículas a administrar à dosagem pretendida de EPO (em U). No caso de, por exemplo, o grau de carregamento montar a 0,4% (que corresponde a 40 µg de EPO por 10 mg de micropartículas) e a dosagem de EPO dever montar a 20 000 U (que corresponde a 125 µg de EPO), deve administrar-se uma quantidade de micropartículas igual a 31,25 mg. Esta quantidade corresponde a uma dose mensal presumível de EPO no sistema DDS.

Surpreendentemente, os Requerentes descobriram que a utilização de copolímeros de tribloco de ABA em combinação com aditivos possibilita uma libertação contínua dos polipéptidos durante um maior intervalo de tempo – pelo menos no entanto duas semanas – e que por meio dos aditivos se consegue um considerável efeito de diminuição da agregação. De acordo com a presente invenção interessam polímeros de bloco ABA, cujo bloco A possui um peso molecular compreendido entre 2 000 e 150 000, e cujo bloco B possui um peso molecular compreendido entre 1 000 e 15 000. O bloco B especialmente possui um peso molecular compreendido entre 3 000 a 10 000. São especialmente preferidos polímeros de bloco ABA com um peso molecular de 5 000 – 50 000 Dalton, de preferência 10 000 – 30 000 e com uma polidispersabilidade de 1,1 – 8,5 ou 1,1 – 5,5, de preferência 1,5 – 4,5 e de maneira especialmente preferida de 2 – 4.

O Quadro 5 apresenta uma vista geral sobre os copolímeros ABA utilizáveis de acordo com a presente invenção que se diferenciam pela sua composição relativamente à proporção lactido/glicolido/PEG, ao peso molecular e à polidispersabilidade. De acordo com a presente invenção, a proporção de

polietilenoglicol (proporção de PEG) no polímero em bloco monta a 20 até 50% em moles, relativamente à quantidade total de polímero, de preferência 25 a 45% em moles. Como especialmente vantajosa para a duração da libertação e para a libertação contínua da substância activa verificou-se ser uma proporção de PEG compreendida entre 30 e 40% em moles, em especial 30 a 38% em moles, preferivelmente 30 a 35% em moles. Preferivelmente, o teor percentual de PEG do copolímero em bloco ABA monta a cerca de 32 ou 33% em moles.

O teor percentual de LA no copolímero em bloco ABA monta de preferência a 40 a 60% em moles, especialmente a 45-60% em moles. São preferidas percentagens molares de cerca de 46%, 51% ou 57%. O teor percentual de GA no copolímero em bloco ABA monta de preferência a 5 até 25%, em especial a 10 até 25%. Os valores percentuais preferidos são cerca de 11%, 16% ou 22%.

A proporção de ácido láctico para ácido glicólico no polímero em bloco está compreendida entre 1:1 e 5:1, em especial monta a 1,5:1 até 4,5:1. É especialmente preferida uma proporção LA/GA compreendida entre cerca de 2:1 e 4:1. Copolímeros de tribloco ABA especialmente preferidos de acordo com a presente invenção são polímeros com uma proporção de LA/GA = 4:1 e um teor de polietilenoglicol de 30-38%. Especialmente interessa um polímero com uma proporção LA:GA:PEG = 57:11:32; 51:16:33; 50:12:38 ou 46:22:32.

As modificações dos polímeros mencionadas em último lugar proporcionam um óptimo da velocidade de degradação e teor de PEG. Um teor de PEG maior origina na verdade uma degradação ainda mais rápida mas, por outro lado, também provoca propriedades mecânicas piores das micropartículas e possivelmente também acções de permuta entre PEG e polipeptido.

258

A preparação dos copolímeros de tribloco ABA pode realizar-se de acordo com processos conhecidos na literatura (vide *Journal of Controlled Release* 27, 1993, 247-257).

Surpreendentemente os Requerentes descobriram que os aditivos de acordo com a presente invenção, além do seu efeito de evitar a agregação, podem realizar um aumento significativo da duração da libertação, em comparação com micropartículas ABA sem aditivos. Isto acontece especialmente para as proteínas do soro de acordo com a presente invenção que originam um aumento da duração da libertação do polipéptido por exemplo até 29 dias (vide Exemplo 4). Como proteínas do soro utilizam-se preferivelmente albumina do soro bovino ou albumina do soro humano. No caso de se adicionarem aditivos de acordo com a presente invenção especialmente BSA e beta-hidroxipropil-ciclodextrina, micropartículas PLGA, então verifica-se igualmente um efeito de diminuição da agregação e, por consequência, uma estabilização dos péptidos sensíveis à agregação.

Intervalos de tempo de libertação longos deste tipo de até 29 dias de polipéptidos a partir de micropartículas à base de PLGA ou de copolímeros de tribloco ABA são conhecidos até hoje apenas com um elevado grau de carregamento, embora não para aqueles casos em que a quantidade de substância activa nas micropartículas é muito pequena, como é por exemplo o caso de EPO. No caso de se utilizar EPO num grau de carga maior (por exemplo, cerca de 3%) nas micropartículas ABA, a proteínas liberta-se durante 29 dias (vide Quadro 4B). Especialmente pode verificar-se que se obtém uma libertação prolongada, no caso de se adicionar um ácido monocarboxílico, em especial ácido benzóico, à fase

258

polimérica na preparação das micropartículas. Isto acontece especialmente no caso de graus de carregamento menores mencionados antes.

As micropartículas de acordo com a presente invenção podem conter como aditivos também aminoácidos, como por exemplo arginina, glicina, lisina ou fenilalanina, ciclodextrinas ou derivados de dextrina como por exemplo beta-hidroxiopropil-ciclodretrina (HPCD). Igualmente, de acordo com a presente invenção, como aditivos podem-se utilizar poliaminoácidos como por exemplo poliarginina ou poli-histidina ou também misturas de ciclodextrinas ou de derivados de ciclodextrina com aminoácidos ou poliaminoácidos como por exemplo HPCD com poliarginina. Também se pode utilizar misturas de dextransos com derivados de ciclodextrina, por exemplo com HPCD ou com ciclodextrinas. Os dextransos utilizados possuem um peso molecular compreendido entre 20 000 e 60 000; é especialmente preferido dextrano 40 000.

Juntamente com as proteínas de soro, de acordo com a presente invenção utilizam-se como aditivos misturas de dextransos e poliarginina ou misturas de dextransos e poli-histidina como aditivos, de maneira especialmente preferida.

As micropartículas de acordo com a presente invenção contêm os aditivos numa quantidade de 0,5 – 40% em peso, calculada em relação à quantidade total de micropartículas, de preferência de 1 – 30%. São especialmente preferidos 1 – 20% em peso. No caso dos sacáridos, utilizam-se de preferência quantidades de 5 – 15% em peso. No caso dos poliaminoácidos, a quantidade do aditivo monta especialmente a 1 – 5% em peso. A ciclodextrina e derivados de ciclodextrina são adicionados de preferência numa quantidade de 2 – 20% em peso. A quantidade de BSA ou HAS monta preferivelmente a 2 - 20% em peso calculada em relação ao

peso total das partículas. A quantidade de ácidos carboxílicos monta especialmente até 15%, preferivelmente aproximadamente 10%.

A invenção refere-se também a um processo para a preparação de micropartículas que contêm polipéptido com o auxílio do processo de emulsão tripla que se caracteriza pelo facto de, na preparação das fases “oleosas” ou orgânicas, por dissolução de um polímero num dissolvente orgânico não miscível com água como polímero se utilizar um copolímero tribloco ABA, cujo bloco A é um copolímero de ácido láctico e de ácido glicólico e cujo bloco B representa uma cadeia de polietilenoglicol e do polipéptido aquoso dissolvido que é emulsionado na fase orgânica, se adicionam aditivos que são escolhidos do grupo constituído pelas proteínas de soro, poliaminoácidos, ciclodextrinas; derivados de ciclodextrina, sacáridos, como por exemplo dissacáridos e polissacáridos; aminoaçúcares; aminoácidos, detergentes ou ácidos carboxílicos assim como as suas misturas.

Verificou-se que a primeira fase de homogeneização (formação de emulsão W/O – água em óleo) parece ser especialmente responsável pela formação de agregados de polipéptido. De acordo com a invenção, encurtou-se o tempo de dispersão de 60 para 30 segundos, como homogeneizador utilizou-se um Ultra-Turrax e a proporção em peso água/fase orgânica (de preferência diclorometano) subiu de 5 para até 20% (percentagem em peso). De preferência na primeira fase de homogeneização dispersou-se duas vezes durante cerca de 30 segundos, com um intervalo de cerca de 30 segundos. De maneira especialmente vantajosa, dispersa-se uma vez durante cerca de 30 segundos. Por meio desta modificação das condições de preparação foi possível obter uma ligeira diminuição da proporção de agregados.

No sentido do processo de preparação de acordo com a presente invenção é especialmente vantajoso que, durante todo o processo de preparação, todas as soluções e aparelhos sejam arrefecidos a 0 - 6°C. Desta forma, consegue-se uma redução especialmente favorável dos agregados de proteína. É neste caso realmente possível renunciar à adição de substâncias aditivas que inibem a agregação. Em comparação com a preparação das micropartículas à temperatura ambiente, foi possível deste modo efectuar uma redução nítida do teor de agregados dos polipéptidos utilizados nas micropartículas (redução de 10 - 20% do teor de agregados para um teor de agregados de 2 - 5%).

A proporção em peso água/fase orgânica de 20-25% (3 - 4 partes de dissolvente orgânico/uma parte de água) possibilita além disso a utilização de uma maior quantidade de aditivos na fase aquosa interna.

As micropartículas de acordo com a presente invenção surpreendentemente possuem também um extremamente menor teor de dissolvente residual. As micropartículas preparadas com o polímero ABA contêm menos do que 1%, de preferência menos do que 0,1%, em especial menos do que 0,01% de dissolvente residual, como por exemplo diclorometano. Evidentemente, por meio dos parâmetros do processo escolhidos conseguiu-se uma eliminação quase completa do diclorometano das micropartículas obtidas, o que é sobretudo atribuído à proporção favorável do volume da fase orgânica para a fase aquosa exterior.

Para excluir a influência da água residual sobre a estabilidade das proteínas, determinou-se também o teor de água residual nas micropartículas. O teor de água determinado de 0,2% mostrou que a proporção de água da fase aquosa interna utilizada pode ser quase completamente eliminada.

ZSS

Ensaio da estabilidade de armazenagem das micropartículas de acordo com a presente invenção mostraram que estas são estáveis em armazenagem pelo menos durante 2 meses à temperatura ambiente (20-25°C) e não apresentam alterações relativamente à formação de agregados e ao comportamento de libertação.

É ainda objecto da invenção a utilização de aditivos farmacêuticos escolhidos do grupo constituído por proteínas do soro, poliaminoácidos; ciclodextrinas; derivados de ciclodextrina; sacáridos; aminoaçúcares; aminoácidos; detergentes assim como misturas destes aditivos para evitar a formação de agregados de polipéptidos sensíveis à agregação na preparação das micropartículas que contêm polipéptidos.

Nos seguintes exemplos de realização esclarece-se mais pormenorizadamente a invenção sem a limitar.

**Exemplo 1:**

**Processo para a Fabricação de Micropartículas que contêm EPO (Método W/O/W -  
- água em óleo e em água)**

Comprou-se um polímero de D,L-PLGA (LA:GA=50:50; RG503) a Boehringer Ingelheim e preparou-se um copolímero ABA (LA:GA:PEG=50:12:38) como se descreveu em "Journal of Controlled Release 27, 1993, 247-257".

Preparou-se respectivamente uma solução do D,L-PLGA e do polímero de bloco ABA em diclorometano, para o que se dissolveram 700 mg do polímero em 2,5 ml (3,3 g) de diclorometano. Misturam-se 3,5 mg de EPO (em 0,2 ml de tampão de fosfato de sódio, pH 7,4) com aditivos de acordo com as necessidades (1% - 20% em peso em relação à quantidade total de micropartículas) e completa-se com água até perfazer 0,8 ml (0,8 g).

ZS

Adiciona-se a solução aquosa de EPO à solução de polímero e, com auxílio de um Ultra-Turrax (30 segundos, 30 s de Pausa, 30 s, 20-24°C, 20 000 rotações ou uma vez durante 30 segundos) prepara-se uma emulsão W/O (água em óleo. Em seguida, dispersa-se a emulsão W/O (água em óleo) por pulverização em 300 ml de solução aquosa a 0,1% de PVA com o auxílio de um Ultra-Turrax a 8000 rotações/min durante 30 segundos (preparação de uma emulsão tripla W/O/W – água em óleo e em água).

Para a vaporização da fase orgânica de diclorometano, agita-se a emulsão W/O/W (água em óleo e em água) durante 2 a 3 horas à temperatura ambiente com o auxílio de um agitador de pás (evaporação do solvente). As MP formadas e endurecidas são isoladas por filtração sob sucção, lavadas duas vezes com 200 ml de água de cada vez e liofilizadas. As micropartículas são colocadas num exsiccador sobre gel de sílica azul a 4°C-8°C.

### **Exemplo 2:**

#### **Estabilização de Micropartículas contendo EPO**

Prepararam-se micropartículas de acordo com o método usual, como se descreveu no Exemplo 1, em que foram utilizados diferentes aditivos em diferentes quantidades, relativamente à quantidade de micropartículas totais.

Em seguida, determinou-se a formação de agregados da substância activa EPO por meio de SDS-PAGE depois da extracção de EPO a partir das micropartículas (a) ou da solvatação das micropartículas em DMSO ou mistura DMSO/DMF (30:70) (b) de acordo com a seguinte maneira de proceder:

- a) Dissolveram-se 10 mg de MP em 300 µl de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e precipitou-se EPO por adição de 700 µl de acetona. Centrifugou-se o precipitado de EPO. Lavou-se

ZSS

2x com 1 ml de mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acetona (1:3) e, em seguida, secou-se em vácuo. Dissolveu-se o precipitado em tampão de ensaio para SDS-PAGE (composição: 60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% de glicerina; 0,001% azul de bromofenol), carregou-se directamente para um gel a 12,5 ou 15% de SDS e submeteu-se a uma electroforese.

- b) Dissolveram-se 10 mg de MP em 200  $\mu\text{l}$  de DMSO/DMF (30:70). Carregaram-se 25  $\mu\text{l}$  (que corresponde a cerca de 5  $\mu\text{g}$  de EPO) directamente para um gel SDS a 15% e submeteram-se a uma electroforese.

Depois de terminada a electroforese, os geles ou:

- aa) foram corados com Coomassie e medidos densitometricamente com um detector de laser, ou
- bb) manchou-se sobre nitrocelulose, coraram-se por meio de um anticorpo específico de EPO as bandas que contêm EPO e mediu-se densitometricamente com um detector de laser.

Verificou-se que em micropartículas ABA (LA:GA:PEG=50:12:38) foi possível diminuir a proporção de agregado total de EPO de cerca de 15-30% para um valor inferior a 1% por inclusão de BSA. Além disso, poli-L-arginina ou poli-L-histidina, também em combinação com dextrano 40 000, demonstraram uma nítida acção de redução dos agregados. Estes aditivos foram utilizados numa quantidade de 1 a 10% em peso relativamente à quantidade total de micropartículas (vide Quadro 1).

Também em micropartículas EPO-PLGA se atinge uma redução dos agregados por meio de aditivos. Neste caso demonstraram ter uma acção extraordinariamente conveniente especialmente BSA e  $\beta$ -hidroxi-propil-

ZSS

-ciclodextrina (proporção de agregado inferior a 1%) (vide Quadro 2). Nas micropartículas com PEG como aditivo verificou-se pelo contrário um aumento da proporção de agregados. Igualmente se observou em micropartículas que contêm PEG ou Pluronic F127 com pelo menos 4% de proporção de substância auxiliar um aparecimento multiplicado de micropartículas deformadas.

**Quadro 1:** Aditivos e sua Influência sobre a Situação do Agregado

Material de adição	% em p/p das partículas totais	Agregação ↑ = aumentada - = inalterada ↓ = diminuída
sem (temperatura ambiente)		10-20%
sem (0 - 4°C)		↓
Albumina de soro bovino	5	↓↓↓↓
Albumina de soro bovino	10	↓↓↓↓
Dextrano 40 000	5	↓
Dextrano 20 000	5	-
Poli-L-arginina	1-5	↓↓
Poli-L-histidina	1-5	↓↓
Poli-L-arginina	2,5	↓
β-Hidroxipropil-ciclodextrina	2,5	
Dextrano 40 000	2,5	↓↓
β-Hidroxipropil-ciclodextrina	2,5	
Poli-L-arginina	1-5	↓↓
Dextrano 40 000	5	
Poli-L-histidina	1-5	↓↓
Dextrano 40 000	5	
β-Hidroxipropil-ciclodextrina	5-15	↓
Arginina	5	↓
Acido benzóico	10	-
Tween 20	0,5	↓
Pluronic F68	0,5	↓
Pluronic F127	0,5	↓
<u>Para Comparação:</u>	Δ	↑↑
Fosfato de Na 100 mM	15	

ZSS

Quadro 2:

Aditivos e sua Influência sobre a Situação do Agregado em Micropartículas de PLGA

Material de adição	% em p/p das partículas totais	Agregação ↑ = aumentada - = inalterada ↓ = diminuída	Ecloração Inicial [%]
Sem		8-10%	29
BSA	5	↓↓	40
BSA	10	↓↓	40
CD	5	↓↓	30
CD	10	↓↓	40
CD	15	↓↓	40
CD/PEG 10 000	5/5	↓	7
CD/Pluronic F127	5/5	↓	8
CD/Tre-halose	5/5	↓	30
Dextrano 40 000	5	↓	10
D40/Poli-(L)-arginina	5/1	↓	n.b.
Arginina	0,2	↓	15
Arginina	4,8	↓	18
PEG 1 550	0,43	-	12
PEG 1 550	4,3	↑	1,3
PEG 10 000	10	↑	0,6
PEG 35 000	10	↑	n.b.
Pluronic F127	10	↓	20

n.b.: não determinado

Exemplo 3:Influência de Aditivos sobre a Libertação de EPO a partir de Micropartículas de PLGA

Prepararam-se micropartículas à base de polímeros de D,L-PLGA (RG503, MG=40 000; LA:GA=50:50; polidispersabilidade 2,4) com um teor de substância activa de EPO igual a 0,5% (calculado em relação à quantidade total de micropartículas) de acordo com o Exemplo 1, em que na preparação se utilizaram diferentes aditivos (% em p/p relativamente à quantidade total de micropartículas).

ZSS

A determinação das velocidades de libertação (em % da quantidade de substância activa encapsulada/por dia) realizou-se de acordo com a seguinte maneira de proceder:

Pesaram-se respectivamente 15 mg de micropartículas para vasos de Eppendorf de 2 ml e misturou-se com 1,5 ml de tampão PBS e 0,01% de Tween 20, pH 7,4. Estes tubos de ensaio foram colocados num bloco metálico rotativo termostaticado a 37°C (Rotatherm, Fa. Liebisch, 30 rotações/min). Após decorrerem os intervalos de tempo depois da toma, retiraram-se as amostras e o meio de libertação foi completamente trocado por um novo meio. Determinaram-se as seguintes velocidades de libertação para as seguintes micropartículas:

### Quadro 3

Libertação in vitro de EPO a partir de micropartículas de PLGA (50:50)

Libertação em %/Dia (calculado em relação à quantidade total de EPO existente nas MP)

Dia:	1	2	3	7	11	14	18	21	25	29
Aditivo										
Sem	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10% BSA	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10% HPCD	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5% Arg	19	0,1	0,05	-	-	-	-	-	-	-
5% Dextr 40	9,2	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
5% Dextr 40 1% Poliarg	5,7	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-

Dextr 40: Dextrano 40 000

Poliarg: Poliarginina

Arg: Arginina

HPCD:  $\beta$ -Hidroxiopropil-ciclodextrina

ZSS

BSA: Albumina de soro bovino

A partir destes resultados torna-se claro que em micropartículas de PLGA a libertação de EPO, independentemente dos aditivos, dura apenas até ao máximo de 24-36 horas e que então não se realiza a libertação contínua. Por meio dos aditivos modifica-se simplesmente o valor da inclusão inicial. Não se consegue uma libertação retardada da EPO com os aditivos.

**Exemplo 4:**

**Influência de Aditivos sobre a Libertação de EPO a partir de Micropartículas de ABA**

Prepararam-se micropartículas à base de copolímeros de tribloco ABA com LA:GA:PEG=57:11:32 (Polímero A) e LA:GA:PEG=50:12:38 (Polímero B) com um teor da substância activa EPO respectivamente igual a 0,5 % em peso (calculado em relação à quantidade total de micropartículas) de acordo com o Exemplo 1, em que se utilizaram diferentes aditivos (% em p/p em relação à quantidade total de micropartículas). A determinação das velocidades de libertação realizou-se como se descreveu no Exemplo 3. Os resultados são reunidos no Quadro 4. Os Polímeros A e B foram predominantemente comparáveis relativamente ao comportamento de libertação da substância activa.

258

Quadro 4A:

Libertação in vitro de EPO a partir de Micropartículas de ABA (a 0,5% de grau de carregamento)

Libertação em %/Dia (relativamente à quantidade total de EPO existente nas MP)

Aditivo	Dia:	1	2	3	7	11	14	18	21	25	29
Sem		12,7	1,8	0,5	0,26	0,02	-	-	-	-	-
5% BSA		4,6	1,6	0,5	0,4	0,12	0,06	0,07	0,04	0,03	0,04
10% BSA		3,7	1,6	0,4	0,4	0,25	0,14	0,11	0,08	0,04	0,04
5% Dextr 40		9,0	1,1	n.d.	0,85	0,3	0,22	0,1	-	-	-
5% Dextr 40 1% Poliarg		17,0	3,0	n.d.	2,8	1,3	0,34	0,17	-	-	-
10% Acido benzóico*		18,4	3,9	3,4	2,5	1,3	0,7	0,2	0,1	-	-
10% HPCD		23,2	3,1	2,0	1,2	0,5	0,12	0,07	-	-	-
5% Arg		38	4,5	3,5	0,7	0,3	0,03	0,02	-	-	-

Dextr 40: Dextrano 40 000

Poliarg: Poliarginina

Arg: Arginina

HPCD:  $\beta$ -Hidroxiopropil-ciclodextrina

BSA: Albumina de soro bovino

n.d. não determinado

\* aditivo adicionado à fase polimérica

A partir do Quadro 4A é nítido que, ao contrário das micropartículas de PLGA, nas micropartículas ABA se pode conseguir uma libertação contínua de EPO até por exemplo ao dia 29, especialmente no caso da utilização de BSA como aditivo.

Comparando a libertação in vitro de EPO a partir de micropartículas de PLGA (50:50) e a partir de micropartículas de ABA de diferentes composições dos monómeros com um teor de substância activa de 0,5% ou 3,4% - respectivamente

ZSS

sem aditivos – então é nitida a superioridade das micropartículas de ABA de acordo com a invenção.

#### Quadro 4B:

Comparação da Libertação in vitro de EPO a partir de Micropartículas de PLGA e de ABA com Diferentes Composições do Monómero ou Diferente Grau de Carregamento sem Outros Aditivos

Libertação em %/Dia (calculado em relação à quantidade total de EPO existente nas MP)

MP de polímero Grau de carregamento (em %)	Dia:	1	2	3	7	11	14	18	21	25	29
PLGA (50:50) (0,5%)		29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ABA (57:11:32) (0,5%)		12,7	1,8	0,5	0,26	0,02	-	-	-	-	-
ABA (51:16:33) (0,5%)		31	n.b.	1,6	0,7	0,4	0,1	-	-	-	-
ABA (46:22:32) (0,5%)		15	n.b.	3,2	1,0	0,5	0,2	0,1	-	-	-
ABA (51:16:33) (3,4%)		11,7	2,2	1,8	0,8	0,2	0,17	0,2	0,2	0,13	0,1

n.b. = não determinado

A partir do Quadro 4B conclui-se que, com um pequeno grau de carregamento (0,5%), a libertação a partir de micropartículas de ABA se limita a 11-18 dias se não se adicionarem aditivos. No caso dos copolímeros de tribloco ABA verifica-se uma duração de libertação mais prolongada em comparação com as partículas de PLGA com o mesmo grau de carregamento. A duração da libertação prolonga-se a um maior teor de GA em copolímeros de tribloco ABA (assim libertação mais longa no caso de teores crescentes de GA de 11, 16 ou 22% em peso).

#### Exemplo 5:

No seguinte Quadro 5 reúnem-se as propriedades químicas e físicas de alguns polímeros do bloco de ABA numa vista geral.

258

Quadro 5:

Vista geral dos Copolímeros de tribloco de ABA utilizados

Carga	LA/GA/PEG	Peso molecular [Da]	Tg [°C]	Polidispersibilidade
1	64/13/23	25 000	47,9	3,1
2	57/11/32	19 000	46,3	2,5
3	50/12/38	20 000	46,1	2,3
4	45/9/46	17 000	42,1	2,8
5	36/35/29	16 400	35,3	6,8
6	46/22/32	16 700	45,1	5,4
7	42/28/30	17 200	31,1	8,4
8	51/16/33	18 500	47,9	4,6
9	40/20/40	13 500	23,7	5,2

As MP que contêm EPO preparadas a partir dos copolímeros de tribloco de ABA indicados no Quadro 5 possuem temperaturas de transição vítrea (Tg) compreendidas no intervalo de 27-45°C. Por consequência, é possível uma armazenagem estável durante longos intervalos de tempo das MP em frigorífico (4-8°C).

Exemplo 6:

Preparação de micropartículas sobre arrefecimento para a redução da formação de agregados.

A preparação das microcápsulas realizou-se como se descreveu no Exemplo 1 com as seguintes alterações:

Todas as soluções (solução de polímero em diclorometano, solução de EPO em tampão de fosfato de sódio e solução de PVA) foram previamente arrefecidas num banho de gelo (0°C) em câmara frigorífica. Todos os recipientes e equipamento (por exemplo, Ultrathurrax) foram previamente arrefecidos em câmara frigorífica (4°C). Todas as fases para a preparação das micropartículas, inclusive a agitação da

ZSS

emulsão w/o/w para o endurecimento das micropartículas e para a evaporação do diclorometano realizaram-se em banho de gelo em câmara frigorífica. A medição da temperatura da solução de PVA a 0,1% depois da preparação da emulsão w/o/w deu como resultado 1°C.

As micropartículas acima preparadas tinham as seguintes propriedades vantajosas: o grau de carregamento prático de EPO era maior do que do processo corrente (0,54% em vez de 0,4%). O teor de agregado em micropartículas sem adições de estabilização foi menor (2-5% em vez de 10-20%). O teor de agregado foi determinado de maneira análoga ao processo descrito no Exemplo 2.

Significação das abreviaturas:

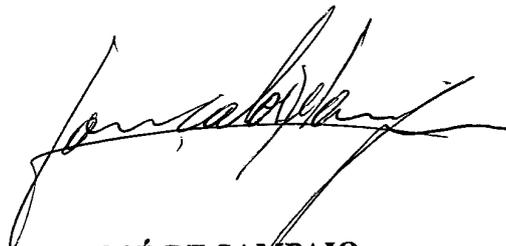
MP:	Micropartículas
PLGA:	Copolímeros de ácido láctico e de ácido glicólico
LA:	Ácido láctico (lactic acid)
GA:	Ácido glicólico (glycolic acid)
ABA:	Copolímeros em bloco triplo de bloco A e de bloco B
Bloco A:	Copolímero de ácido láctico e ácido glicólico
Bloco B:	Polietilenoglicol (PEG)

BSA: Albumina de soro bovino  
HAS: Albumina de soro humano  
PVA: Álcool polivinílico  
D40: Dextrano 40 000

Lisboa, 22 de Agosto de 2001



Agente Oficial da Propriedade Industrial



**JOSÉ DE SAMPAIO**  
A.O.P.I.  
Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.  
1269-063 LISBOA

ZSS

## Reivindicações

1. Formas de apresentação de composições farmacêuticas com a forma de micropartículas que consistem numa matriz polimérica contendo uma substância activa, em que o polímero é um copolímero em tribloco ABA, cujo bloco A representa um copolímero de ácido láctico e de ácido glicólico e cujo bloco B representa uma cadeia de polietilenoglicol, caracterizadas pelo facto de a substância activa ser um polipéptido sensível à agregação e as micropartículas conterem aditivos que são escolhidos do grupo constituído por proteínas do soro, poliaminoácidos, ciclodextrinas; derivados de ciclodextrina; sacáridos; amino-açúcares; aminoácidos; detergentes ou ácidos carboxílicos assim como misturas destas adições.

2. Formas de apresentação de composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo facto de os aditivos serem escolhidos do grupo que consiste em albumina de soro, poliaminoácidos; aminoácidos; sacáridos; derivados de ciclodextrina e detergentes.

3. Formas de apresentação de composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo facto de os aditivos serem escolhidos de misturas de dextranos e poliaminoácidos; misturas de ciclodextrinas ou de derivados de ciclodextrina com aminoácidos; misturas de ciclodextrina ou de derivados de ciclodextrina com poliaminoácidos; misturas de ciclodextrinas ou de derivados de ciclodextrina com dextranos; ou uma misturas de dextranos com aminoácidos.

ZSS

4. Formas de apresentação de composições farmacêuticas de acordo com qualquer das reivindicações 1-3, caracterizadas pelo facto de, como aditivos, na polimérica serem contidos ácidos carboxílicos.

5. Formas de apresentação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizadas pelo facto de o polímero de bloco ABA possuir um peso molecular compreendido entre 5000 e 50000 Dalton, de preferência entre 10000 e 30000.

6. Formas de apresentação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, caracterizadas pelo facto de a proporção de polietilenoglicol no copolímero ABA estar compreendida entre 20 e 50% em peso, em relação à quantidade total de polímero, de preferência entre 30 e 40% em peso.

7. Formas de apresentação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, caracterizadas pelo facto de a proporção de ácido láctico para ácido glicólico no copolímero ABA estar compreendida entre 1:1 e 5:1, de preferência entre 1,5:1 e 4,5:1.

8. Formas de apresentação de acordo com a reivindicação 7, caracterizadas pelo facto de a proporção de ácido láctico para ácido glicólico montar a 4:1, de preferência 2:1.

9. Formas de apresentação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizadas pelo facto de os aditivos serem contidos numa quantidade de 0,5 a 40% em peso, relativamente à quantidade total de micropartículas, de preferência 1-30% em peso.

10. Formas de apresentação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 9, caracterizadas pelo facto de conterem, como poliaminoácidos, poliarginina ou

ZSS

poli-histidina, especialmente poli-L-arginina ou poli-L-histidina, como aminoácidos conterem arginina, glicina, fenilalanina, ácido glutâmico ou lisina, como sacáridos, tre-halose, sacarose, maltose, amido, maltodextrinas, rafinose, alginato, dextranos, como aminoaçúcar quitosano ou como detergentes ou triglicéridos Tween20®, Tween 80®, Pluronic® ou Miglicol®.

11. Formas de apresentação de acordo com a reivindicação 10, caracterizadas pelo facto de, como dextranos, conterem dextranos com um peso molecular compreendido entre 20 000 e 60 000, de preferência igual a 40 000.

12. Formas de apresentação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 11, caracterizadas pelo facto de, como aditivos, conterem misturas de dextranos com poliarginina ou poli-histidina, de preferência misturas de dextrano 40 000 com poli-L-arginina ou mistura de dextrano 40 000 com poli-L-histidina.

13. Formas de apresentação de acordo com qualquer das reivindicações 1-9, caracterizadas pelo facto de, como aditivo, conterem proteínas do soro, de preferência albumina de soro bovino ou humano.

14. Formas de apresentação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 13, caracterizadas pelo facto de o teor de polipéptidos nas micropartículas estar compreendido entre 0,01% e 5% em peso, calculados em relação à quantidade total de micropartículas, de preferência entre 0,01% e 3% em peso.

15. Formas de apresentação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 14, caracterizadas pelo facto de como polipeptídico conter eritropoietina.

16. Processo para a preparação de micropartículas que contêm polipéptidos com o auxílio do processo de emulsão tripla, que compreende as fases:

ZSS

- a) dissolução de um copolímero de tribloco de ABA, cujo bloco A é um copolímero de ácido láctico e de ácido glicólico e cujo bloco B representa uma cadeia de polietilenoglicol, num dissolvente orgânico, não miscível com água, eventualmente com a adição de um ácido carboxílico;
- b) adição de uma solução ou de uma suspensão de um polipéptido, em que a solução ou a suspensão contém outros aditivos, que são escolhidos do grupo que consiste em proteínas do soro, poliaminoácidos; ciclodextrinas; derivados de ciclodextrina; sacáridos; aminoaçúcares; aminoácidos, detergentes assim como misturas destes aditivos e preparação de uma emulsão W/O numa primeira operação de homogeneização;
- c) preparação de uma emulsão W/O/W numa segunda operação de homogeneização por dispersão da emulsão W/O obtida numa solução aquosa que contém agente estabilizador; e
- d) vaporização do dissolvente e subsequente isolamento das micropartículas.

17. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de na primeira fase de homogeneização, como homogeneizador, se utilizar um Ultra-Turrax e se despegar uma vez durante 30 segundos ou duas vezes durante 30 segundos, com uma pause de 30 segundos entre elas.

18. Processo de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo facto de se escolher uma proporção em peso de água/fase orgânica de até 20-25% .

19. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 16-18, caracterizado pelo facto de todo o processo de preparação se realizar a temperaturas compreendidas entre 0 e 6°C.

20. Utilização de aditivos farmacêuticos escolhidos do grupo formado por proteína de soro, poliaminoácidos; ciclodextrinas; derivados de ciclodextrina; sacáridos; aminoaçúcares; aminoácidos; detergentes ou ácidos carboxílicos assim como misturas destes aditivos para evitar a formação de agregados de polipéptidos sensíveis à agregação na fabricação de micropartículas que contêm polipéptido.

Lisboa, 22 de Agosto de 2001

 O Agente Oficial da Propriedade Industrial



**JOSÉ DE SAMPAIO**  
A.O.P.I.  
Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.  
1269-063 LISBOA

## Resumo

### “Formas de administração farmacêuticas contendo polipéptidos sob a forma de micropartículas e processo para a sua preparação”

A invenção refere-se a formas de administração farmacêuticas parentéricas contendo polipéptidos sob a forma de micropartículas e ao processo para a sua preparação. De acordo com a invenção, as micropartículas contêm como polímero biodegradável um copolímero de tribloco ABA cujo bloco A é um copolímero de ácido láctico e de ácido glicólico e cujo bloco B é uma cadeia de polietilenoglicol, conjuntamente com aditivos que são escolhidos do grupo das proteínas de soro, poliaminoácidos, ciclodextrinas; derivados de ciclodextrinas; sacáridos; amino-açúcares; aminoácidos; detergentes ou ácidos carboxílicos assim como misturas destes aditivos. As micropartículas de acordo com a presente invenção libertam continuamente o polipéptido durante um longo intervalo de tempo mesmo quando as quantidades de polipéptido incluem que sejam pequenas ou sensíveis à agregação.

Lisboa, 22 de Agosto de 2001

○ Agente Oficial da Propriedade Industrial

**JOSÉ DE SAMPAIO**

A.O.P.I.

Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.

1269-063 LISBOA