

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.08.22	(73) Titular(es): MASSEY UNIVERSITY TURITEA CAMPUS PALMERSTON NORTH NZ
(30) Prioridade(s): 2002.08.30 DE 10240035	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.06.15	(72) Inventor(es): BERND HELMUT ADAM REHM NZ
(45) Data e BPI da concessão: 2011.02.02 086/2011	(74) Mandatário: LUÍS MANUEL DE ALMADA DA SILVA CARVALHO RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS FUNCIONALIZADAS, BIODEGRADÁVEIS E A SUA UTILIZAÇÃO COMO TRANSPORTADORES DE MEDICAMENTOS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS FUNCIONALIZADAS, BIODEGRADÁVEIS E À SUA UTILIZAÇÃO COMO TRANSPORTADORES DE MEDICAMENTOS.

RESUMO

**"MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS
FUNCIONALIZADAS, BIODEGRADÁVEIS E A SUA UTILIZAÇÃO COMO
TRANSPORTADORES DE MEDICAMENTOS"**

A invenção refere-se a um método para produção de partículas poliméricas funcionalizadas, biodegradáveis e à sua utilização como transportadores de medicamentos.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS
FUNCIONALIZADAS, BIODEGRADÁVEIS E A SUA UTILIZAÇÃO COMO
TRANSPORTADORES DE MEDICAMENTOS"

EEE

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produção de partículas poliméricas biodegradáveis, que abrange:

a) Pôr à disposição uma célula, em que é introduzido na célula pelo menos um gene induzível, em que o gene codifica uma proteína que controla o tamanho das partículas poliméricas; e

em que pelo menos um gene adicional que codifica uma polímero sintase é introduzido no organismo; e

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento, ou em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína modificada que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento; e

b) Cultivar a célula sob indução de pelo menos um gene induzível mencionado em a), num meio de cultura com condições que são apropriadas para a formação das partículas poliméricas biodegradáveis, pela célula.

2. Método segundo a reivindicação 1, em que a proteína controladora do tamanho é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou em que a proteína controladora do tamanho é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento.

3. Método segundo a reivindicação 1, em que a, pelo menos uma, polímero sintase abrange um domínio de ligação da partícula polimérica e pelo menos um domínio de ligação, ou método segundo a reivindicação 2, em que a, pelo menos uma, polímero sintase e a proteína controladora do tamanho abrangem respectivamente um domínio de ligação da partícula polimérica e pelo menos um domínio de ligação, em que o, pelo menos um, domínio de ligação é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente e/ou com um reagente de acoplamento.

4. Método segundo uma das reivindicações anteriores, em que se controla o tamanho das partículas através do, pelo menos um, gene induzível de tal forma que as partículas poliméricas formadas têm um diâmetro de 10 nm a 3 μ m, especialmente um diâmetro de 10 nm a 900 nm, e especialmente preferido um diâmetro de 10 nm a 100 nm.

5. Método para produção de partículas poliméricas biodegradáveis, que abrange:

a) Pôr à disposição uma célula, em que é

introduzido na célula pelo menos um gene, em que o gene codifica uma polímero sintase;

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento, ou

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína modificada que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento; e

b) Cultivar a célula num meio de cultura com condições que são apropriadas para a formação das partículas poliméricas biodegradáveis, pela célula.

6. Método segundo uma das reivindicações anteriores, em que a célula é cultivada na presença de pelo menos uma substância farmacologicamente activa e/ou um corante, em que o corante é escolhido entre vermelho de Nilo e rodamina 123.

7. Método segundo uma das reivindicações anteriores, em que as células cultivadas são fragmentadas e subsequentemente as partículas poliméricas são isoladas dos restos celulares.

8. Método segundo uma das reivindicações anteriores, em que se separa a camada lipídica que se encontra à superfície da partícula polimérica, das partículas poliméricas, e se substitui por uma camada lipídica com outra composição.

9. Método para produção *in vitro* de partículas poliméricas biodegradáveis, que abrange:

a) Pôr à disposição uma solução apropriada para a formação das partículas poliméricas com pelo menos um substrato;

b) Introdução de uma proteína na solução, que é apropriada para controlar o tamanho das partículas poliméricas; e

c) Introdução de pelo menos uma polímero sintase,

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento, ou

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína modificada que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento.

10. Método segundo a reivindicação 9, em que a

proteína controladora do tamanho é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou em que a proteína controladora do tamanho é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento.

11. Método segundo a reivindicação 9, em que a, pelo menos uma, polímero sintase abrange um domínio de ligação da partícula polimérica e pelo menos um domínio de ligação, ou método segundo a reivindicação 10, em que a, pelo menos uma, polímero sintase e a proteína controladora do tamanho abrangem respectivamente um domínio de ligação da partícula polimérica e pelo menos um domínio de ligação, em que o, pelo menos um, domínio de ligação é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente e/ou com um reagente de acoplamento.

12. Método segundo uma das reivindicações 1-11, em que a, pelo menos uma, polímero sintase é escolhida do grupo que abrange a polímero sintase de *R. eutropha*, *P. oleovorans*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *Aeromonas punctata* e *Thiocapsa pfennigii* ou em que a, pelo menos uma, polímero sintase é phaC de *Ralstonia eutropha*.

13. Método segundo uma das reivindicações 1 a 12, em que a célula é um microrganismo que é escolhido entre os géneros abrangidos pelos seguintes: *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* e *Halobiforma* ou em que a célula é um microrganismo que é escolhido do grupo que abrange os

seguintes: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* ou *Halobiforma haloterrestris*.

14. Método segundo uma das reivindicações 1 a 4 ou 9 a 11, em que a proteína que controla o tamanho das partículas poliméricas é obtida da família das proteínas semelhantes à fasina, inclusive da fasina de *Ralstonia eutropha* e da fasina de *Pseudomonas oleovorans*.

15. Método segundo uma das reivindicações 3 ou 11, em que o, pelo menos um, domínio de ligação que é capaz de se ligar à substância biologicamente activa e/ou ao reagente de acoplamento é escolhido do grupo que abrange os oligopeptídeos, enzimas, abzimas, proteínas não catalíticas, epítipo FLAG, ou pelo menos um resíduo cisteína.

16. Método segundo uma das reivindicações 1 a 15, em que a substância biologicamente activa abrange uma substância farmacologicamente activa.

17. Método segundo uma das reivindicações 1 a 16, em que a proteína biologicamente activa e a substância biologicamente activa é um oligopeptídeo, enzima, abzima, proteína não catalítica ou um anticorpo.

18. Método para produção *in vitro* de partículas

poliméricas biodegradáveis, que abrange:

a) Pôr à disposição uma solução apropriada para a formação das partículas poliméricas com pelo menos um substrato;

b) Introdução de pelo menos uma polímero sintase na solução,

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento, ou

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína modificada que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento.

19. Partícula polimérica com pelo menos uma polímero sintase,

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento, ou

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína modificada que é capaz de se ligar a uma

substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento.

20. Partícula polimérica segundo a reivindicação 19, além disso com pelo menos uma proteína, em que a proteína é escolhida do grupo, que abrange um polímero despolimerase, um polímero-regulador, um polímero sintase e uma proteína que controla o tamanho das partículas,

em que a, pelo menos uma, proteína é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou

em que a, pelo menos uma, proteína é uma proteína de fusão que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento, ou

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína modificada que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento.

21. Partícula polimérica segundo a reivindicação 19 ou 20, produzida segundo um dos métodos descritos nas reivindicações 1-16.

22. Partícula polimérica segundo uma das reivindicações 19 ou 20, em que à volta da partícula polimérica é formada uma camada fosfolipídica e a composição da camada fosfolipídica influencia o transporte da partícula através de uma membrana biológica.

23. Partícula polimérica segundo a reivindicação 19, em que a, pelo menos uma, polímero sintase abrange um domínio de ligação da partícula polimérica e pelo menos um domínio de ligação, ou partícula polimérica segundo a reivindicação 20, em que a, pelo menos uma, polímero sintase e a, pelo menos uma, proteína abrangem respectivamente um domínio de ligação da partícula polimérica e pelo menos um domínio de ligação, em que o, pelo menos um, domínio de ligação é capaz de se ligar à substância biologicamente activa e/ou a um reagente de acoplamento.

24. Partícula polimérica segundo a reivindicação 23, em que a, pelo menos uma, polímero sintase, ou a, pelo menos uma, polímero sintase e a, pelo menos uma, proteína está/estão ligadas à partícula polimérica através do domínio de ligação da partícula polimérica.

25. Partícula polimérica segundo a reivindicação 23, em que a substância biologicamente activa e/ou o reagente de acoplamento estão/está ligadas ao domínio de ligação.

26. Partícula polimérica segundo uma das reivindicações 23 a 25, em que o, pelo menos um, domínio de ligação é escolhido do grupo que abrange os oligopeptídeos, enzimas, abzymas, proteínas não catalíticas, epítipo-FLAG e pelo menos um resíduo de cisteína.

27. Partícula polimérica segundo uma das reivindicações 23 a 26, em que o, pelo menos um, domínio de ligação é criado, ao modificar quimicamente a, pelo menos uma, polímero sintase, ou a, pelo menos uma, proteína ou tanto a, pelo menos uma, polímero sintase como a, pelo menos uma, proteína com um reagente de acoplagem.

28. Partícula polimérica segundo a reivindicação 27, em que a modificação química abrange a ligação de pelo menos um reagente de acoplagem à, pelo menos uma, polímero sintase ou à, pelo menos uma, proteína ou tanto à, pelo menos uma, polímero sintase como à, pelo menos uma, proteína, em que é escolhido do grupo que abrange cloreto de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)ácido fosforoso (BOP-Cl), bromotrispirrolidinafosfoniohexafluorofosfato (Py-BroP), benzotriazol-1-iloxitrispirrolidinafosfoniohexafluorofosfato (PyBOP), n-hidroxisuccinimida-biotina, Hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), dicitclohexilcarbodiimida, disuccinimidil carbonato, 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfina, diisopropilcarbodiimida (DIPC), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotrioxazolil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de 2-(5-norborneno-2,3-dicarboxyimido)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU), ácido clorofórmico-para-nitrofeniléster e tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU).

29. Partícula polimérica segundo uma das reivindicações 19 a 28, em que pelo menos uma substância farmacologicamente activa e/ou um corante são introduzidos na partícula polimérica, em que o corante é escolhido entre vermelho de Nilo ou rodamina 123.

30. Partícula polimérica segundo a reivindicação 29, em que a substância farmacologicamente activa e/ou o corante é libertado através da difusão ou da decomposição da partícula polimérica.

31. Partícula polimérica segundo uma das reivindicações 19 a 30, em que a substância biologicamente abrangida abrange uma substância farmacologicamente activa.

32. Partícula polimérica segundo uma das reivindicações 19 a 30, em que a substância biologicamente activa é escolhido do grupo que abrangida a didesoxi-inosina, floxuridina, 6-mercaptopurina, doxorubicina, daunorubicina, 1-darrubicina, cisplatina, metotrexato, taxol, antibióticos, anticoagulantes, germicidas, antiarrítmicos e precursores de princípios activos ou derivados deles, ou do grupo que abrangida, a insulina, calcitonina, ACTH, glucagon, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiróide, eritropoetina, factores de libertação do hipotálamo, prolactina, tireotropina, endorfina, encefalina, vasopressina, opiácios sintéticos, superóxido dismutase, anticorpos, interferon, asparaginase,

arginase, arginina desaminase, adenosina desaminase, ribonuclease, tripsina, quimotripsina e pepsina.

33. Partícula polimérica segundo uma das reivindicações 19 a 31, em que a proteína biologicamente activa é escolhido do grupo que abrange a insulina, calcitonina, ACTH, glucagon, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiróide, eritropoetina, factores de libertação do hipotálamo, prolactina, tireotropina, endorfina, encefalina, vasopressina, opiácios sintéticos, superóxido dismutase, anticorpos, interferon, asparaginase, arginase, arginina desaminase, adenosina desaminase, ribonuclease, tripsina, quimotripsina e pepsina.

34. Partícula polimérica segundo uma das reivindicações 19 a 31, em que a proteína biologicamente activa e a substância biologicamente activa é um oligopeptídeo, uma enzima, uma abzima, uma proteína não catalítica ou um anticorpo.

35. Utilização de uma partícula polimérica com pelo menos uma polímero sintase, em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou

em que a, pelo menos uma, polímero sintetase é uma proteína de fusão que está ligada directamente ou com um reagente de acoplamento a uma substância biologicamente activa, ou

em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína modificada que está ligada directamente ou com um reagente de acoplamento a uma substância biologicamente activa,

para a produção de um medicamento, de um pesticida ou de um herbicida.

36. Utilização de uma partícula polimérica segundo uma das reivindicações 19 a 34 para a produção de um medicamento apropriado para o tratamento de doenças do sistema nervoso central.

37. Medicamento, pesticida ou herbicida, que abrange uma partícula polimérica com pelo menos uma polímero sintase, em que a, pelo menos uma, polímero sintase é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou em que a, pelo menos uma, polímero sintetase é uma proteína de fusão que está ligada directamente ou com um reagente de acoplamento a uma substância biologicamente activa, ou em que a, pelo menos uma, polímero sintetase é uma proteína modificada que está ligada directamente ou com um reagente de acoplamento a uma substância biologicamente activa.

38. Medicamento que abrange uma partícula polimérica segundo uma das reivindicações 19 a 34, para utilização no tratamento de doenças do sistema nervoso central.

39. Método para ligação de uma substância biologicamente activa, que abrange:

a) Pôr à disposição uma ou várias partículas poliméricas com pelo menos um polímero sintase, em que a, pelo menos um, polímero sintase é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou

em que a, pelo menos um, polímero sintetase é uma proteína de fusão que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento, ou

em que a, pelo menos um, polímero sintetase é uma proteína modificada que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento, e

b) Pôr em contacto a partícula polimérica com uma amostra que abrange uma substância biologicamente activa, de forma que a proteína biologicamente activa ou a, pelo menos um, polímero sintetase se ligue à substância biologicamente activa.

40. Método segundo a reivindicação 39, em que a substância biologicamente activa abrange uma substância farmacologicamente activa.

41. Método segundo a reivindicação 39, em que a proteína biologicamente activa é escolhido do grupo que abrange a insulina, calcitonina, ACTH, glucagon, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona

paratiróide, eritropoetina, factores de libertação do hipotálamo, prolactina, tireotropina, endorfina, encefalina, vasopressina, opiácios sintéticos, superóxido dismutase, anticorpos, interferon, asparaginase, arginase, arginina desaminase, adenosina desaminase, ribonuclease, tripsina, quimotripsina e pepsina.

42. Método segundo a reivindicação 39, em que a proteína biologicamente activa e a substância biologicamente activa é um oligopeptídeo, uma enzima, uma abzima, uma proteína não catalítica ou um anticorpo.

43. Método segundo a reivindicação 39, em que a, pelo menos uma, polímero sintetase abrange um domínio de ligação da partícula polimérica e um domínio de ligação, que é capaz de se ligar à substância biologicamente activa e/ou ao reagente de acoplagem.

44. Método segundo a reivindicação 39, em que o, pelo menos um, domínio de ligação é escolhido do grupo que abrange os oligopeptídeos, enzimas, abzimas, proteínas não catalíticas, epítipo-FLAG ou pelo menos um resíduo de cisteína.

45. Método segundo a reivindicação 43, em que o, pelo menos um, domínio de ligação é criado, ao modificar quimicamente a, pelo menos uma, polímero sintase na superfície da partícula polimérica com um reagente de acoplagem.

46. Método segundo a reivindicação 45, em que a modificação química abrange a ligação de pelo menos um reagente de acoplagem à, pelo menos uma, polímero sintase em que o reagente de acoplagem é escolhido do grupo que abrange cloreto de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)ácido fosforoso (BOP-Cl), bromotrispirrolidinafosfoniohexafluorofosfato (Py-BroP), benzotriazol-1-iloxitrispirrolidinafosfoniohexafluorofosfato (PyBOP), n-hidroxisuccinimida-biotina, hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol--il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), dicitclohexilcarbodiimida, disuccinimidil carbonato, 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfina, diisopropilcarbodiimida (DIPC), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotrioxazolil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de 2-(5-norborneno-2,3-dicarboxiimido)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU), ácido clorofórmico-para-nitrofeniléster e tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU).

47. Partícula, utilização ou composição farmacêutica, pesticida ou herbicida segundo a reivindicação 31, 35, 36, 37 ou 38, em que a partícula apresenta um diâmetro de 10 nm a 3 µm, 10 nm a 100 nm, ou 50 nm a 500 nm.

48. Método segundo a reivindicação 5, em que pelo menos um gene adicional, que codifica uma proteína que

é introduzida na célula, em que a proteína é escolhida do grupo, que abrange uma polímero despolimerase, um polímero-regulador, uma polímero sintase e uma proteína que controla o tamanho das partículas,

em que a, pelo menos uma, proteína adicional é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou

em que a, pelo menos uma, proteína adicional é uma proteína de fusão que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento, ou

em que a, pelo menos uma, proteína adicional é uma proteína modificada que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento.

49. Utilização segundo a reivindicação 35 ou 36, em que além disso a partícula polimérica abrange pelo menos uma proteína adicional, em que a proteína é escolhida do grupo, que abrange uma polímero despolimerase, um polímero-regulador, uma polímero sintase e uma proteína que controla o tamanho das partículas,

em que a, pelo menos uma, proteína adicional é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou

em que a, pelo menos uma, proteína adicional é uma proteína de fusão que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento, ou

em que a, pelo menos uma, proteína adicional é uma proteína modificada que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento.

50. Medicamento, pesticida ou herbicida segundo a reivindicação 37 ou 38, em que além disso a partícula polimérica abrange pelo menos uma proteína adicional, em que a proteína é escolhida do grupo, que abrange uma polímero despolimerase, um polímero-regulador, uma polímero sintase e uma proteína que controla o tamanho das partículas,

em que a, pelo menos uma, proteína adicional é uma proteína de fusão que abrange uma proteína biologicamente activa, ou

em que a, pelo menos uma, proteína adicional é uma proteína de fusão que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento, ou

em que a, pelo menos uma, proteína adicional é uma proteína modificada que é capaz de se ligar a uma substância biologicamente activa directamente ou com um reagente de acoplamento.