



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

(21) **PI0615819-6 A2**

(22) Data de Depósito: 14/09/2006  
(43) Data da Publicação: 24/05/2011  
(RPI 2107)



(51) *Int.Cl.:*  
A61K 9/16 2006.01

(54) Título: **MÉTODO DE FORMULAÇÃO DE FÁRMACO BASEADO NO AUMENTO DA AFINIDADE DE AGENTES ATIVOS PARA SUPERFÍCIES DE MICROPARTÍCULAS CRISTALINAS**

(30) Prioridade Unionista: 14/09/2005 US 60/717.524, 14/04/2006 US 60/744.882, 14/04/2006 US 60/744.882

(73) Titular(es): MANNKIND CORPORATION

(72) Inventor(es): KEITH A. OBERG, MARK HOKENSON

(74) Procurador(es): NELLIE ANNE DANIEL SHORES

(86) Pedido Internacional: PCT US2006035822 de 14/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/033316 de 22/03/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE FORMULAÇÃO DE FÁRMACO BASEADO NO AUMENTO DA AFINIDADE DE AGENTES ATIVOS PARA SUPERFÍCIES DE MICROPARTÍCULAS CRISTALINAS. Métodos são fornecidos para promover a adsorção de um agente ativo em micropartículas pela modificação das propriedades estruturais do agente ativo, com o intuito de facilitar associação favorável à micropartícula.

"MÉTODO DE FORMULAÇÃO DE FÁRMACO BASEADO NO AUMENTO DA AFINIDADE DE AGENTES ATIVOS PARA SUPERFÍCIES DE MICROPARTÍCULAS CRISTALINAS"

REFERÊNCIA CRUZADA PARA PEDIDOS RELACIONADOS

5 O presente pedido reivindica o benefício sob 35 U.S.C. §119(e) para o pedido provisório norte-americano No. de série 60/717.524, depositado em 14 de setembro de 2005 e pedido provisório norte-americano No. de série 60/744.882, depositado em 14 de abril de 2006, o conteúdo completo dos  
10 quais está, por meio disso, incorporado pela referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a formulações de fármacos e está, particularmente, relacionada a métodos. Mais especificamente, a ligação e adsorção de agentes ativos na superfície de micropartículas cristalinas são reveladas.  
15

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A distribuição de agentes terapêuticos tem sido um grande problema. A administração oral é uma das mais comuns e preferidas rotas de distribuição devido à facilidade de  
20 administração, à complacência do paciente, e ao custo reduzido. No entanto, as desvantagens dessa rota incluem adsorção ineficiente e potência baixa ou variável do terapêutico. Isto se torna particularmente evidente quando o composto a  
25 ser distribuído é instável sob condições encontradas no trato gastrointestinal. Uma variedade de métodos de encapsulação e revestimentos vêm sendo desenvolvidos na técnica, mas apenas poucos são eficazes na tentativa de solucionar esse pro-

blema. Existem, ainda, compostos terapêuticos que tendem ser menos ativos nas condições do trato gastrointestinal e devem ser administrados em dosagens mais elevadas, para serem adsorvidos na corrente sangüínea em uma quantidade eficaz.

5           Uma ampla variedade de sistemas de formulação de fármacos vem sendo desenvolvida para tentar solucionar o problema da distribuição de fármacos ideal e baseiam-se na incorporação do fármaco em uma matriz que funciona como um veículo. Os fatores considerados na formulação de fármacos  
10 incluem exigências de que o sistema seja não-tóxico e não-reativo com o fármaco a ser distribuído, econômico na produção, formado com componentes prontamente disponíveis e, consistente com relação à composição final e às características físicas, incluindo estabilidade e taxa de liberação. É pre-  
15 ferível, também, que o sistema de distribuição de fármaco seja formado com materiais facilmente removíveis do corpo por processos fisiológicos normais.

Os avanços na tecnologia de micropartículas têm ajudado no desenvolvimento de formulações de fármacos melho-  
20 radas. No entanto, apesar desses avanços, existe, ainda, uma carência na técnica de formulações de fármacos estáveis com eficácia de longo período e adsorção ideal, quando administradas como um farmacêutico, particularmente, através de meios pulmonares. Uma tentativa para solucionar essa defici-  
25 ência é focar nas características/propriedades do agente ativo que possam promover sua adsorção na superfície da micropartícula e diminuir sua tendência em permanecer em solução.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

São fornecidos métodos para ligar, revestir ou adsorver um agente ativo em uma superfície de micropartícula cristalina. Em geral, as micropartículas são revestidas com um agente ativo pela modificação do sistema compreendendo as micropartículas e o agente ativo dissolvido, de tal forma que o agente ativo tenha uma afinidade maior com a superfície da micropartícula do que em permanecer em solução. Em particular, a presente invenção procura promover, ainda, a adsorção de um agente ativo na superfície da micropartícula pela modificação/utilização das propriedades do agente ativo sob um número de condições em solução.

Assim, na presente invenção, é fornecido um método para promover a ligação de um agente ativo a uma micropartícula cristalina pré-formada em suspensão, compreendendo as etapas de: i) modificação do potencial químico do agente ativo, onde a modificação permite uma interação energeticamente favorável entre o agente ativo e a micropartícula, independente da remoção do solvente; e ii) adsorção do agente ativo na superfície da micropartícula.

Em modalidades particulares da presente invenção, a modificação do potencial químico compreende modificar a estrutura, a flexibilidade, a rigidez, a solubilidade ou a estabilidade do agente ativo, individualmente ou em combinação. A modificação do potencial químico do agente ativo compreende alterar as condições de solução. A alteração das condições de solução compreende adicionar um modificador de agente ativo à solução.

Em modalidades particulares, o modificador de agente ativo é selecionado do grupo consistindo em sais, tensoativos, íons, osmólitos, álcoois, caotrópicos, cosmotrópicos, ácidos, bases e solventes orgânicos. Em uma modalidade, o sal é o cloreto de sódio.

Ainda em outra modalidade da presente invenção, o método compreende, ainda, a etapa de dissolução do agente ativo em uma fase fluida de uma suspensão de micropartículas e alteração do pH da fase fluida. Em um aspecto, a etapa de dissolução do agente ativo em uma fase fluida refere-se à dissolução de um sólido. Em outro aspecto, a etapa de dissolução do agente ativo refere-se à adição de uma solução concentrada do agente ativo.

Em outra modalidade da presente invenção, o modificador de agente ativo melhora a estabilidade estrutural do agente ativo.

Ainda em outra modalidade da presente invenção, o agente ativo é uma proteína, um peptídeo, um polipeptídeo, uma molécula pequena ou uma molécula de ácido nucléico. Em outra modalidade da presente invenção, o agente ativo é selecionado do grupo consistindo em insulina, grelina, hormônio do crescimento e hormônio da paratireóide (PTH). O agente ativo pode compreender um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em vários aspectos da invenção, o anticorpo pode reconhecer um antígeno associado a doenças, incluindo, sem restrições, um antígeno associado a tumor ou um antígeno relacionado a patógeno infeccioso.

Ainda em outra modalidade da presente invenção, a

molécula pequena é uma molécula ionizável ou uma molécula hidrófoba, tal como, mas não limitada a, ciclosporina A.

Em outra modalidade da presente invenção, a modificação do potencial químico do agente ativo compreende modular uma ou mais interações energeticamente favoráveis tais como, mas não limitadas a, interações eletrostáticas, interações hidrófobas, e/ou interações de ligação de hidrogênio entre o agente ativo e a superfície da micropartícula. Em uma modalidade, a micropartícula compreende uma dicetopiperazina tal como, mas não limitada a, fumaril dicetopiperazina.

Ainda em outra modalidade da presente invenção, o método compreende, ainda, uma etapa de remoção ou troca do solvente. Solvente, como referido aqui, refere-se a um meio fluido, no qual o agente ativo e a micropartícula são "banhados". Não deve ser interpretado que sejam necessários todos os componentes presentes em solução. Na verdade, em várias circunstâncias, isto pode ser usado como referência para o meio líquido, no qual as micropartículas estão suspensas.

Em outra modalidade da presente invenção, é fornecido um processo para preparar uma composição de distribuição de fármaco, compreendendo um agente ativo e uma micropartícula cristalina, compreendendo as etapas de: fornecimento de uma solução de agente ativo compreendendo uma molécula do agente ativo; modificação do potencial químico do agente ativo; fornecimento de uma micropartícula em uma suspensão ou em pó; e combinação da solução de agente ativo com

a suspensão ou pó de micropartícula. O pó pode ser, por exemplo, filtrado, mas não seco.

Em outra modalidade da presente invenção, o processo de modificação do potencial químico do agente ativo  
5 permite a interação entre o agente ativo e uma micropartícula. Em uma modalidade, a modificação do potencial químico do agente ativo compreende adicionar um modificador de agente ativo à solução. Tal modificador de agente ativo pode ser selecionado do grupo consistindo em sais, tensoativos, íons,  
10 osmólitos, álcoois, caotrópicos, cosmotrópicos, ácido, base e solventes orgânicos. Ainda em outra modalidade, o modificador diminui a solubilidade da molécula do agente ativo, promove associação entre o agente ativo e uma micropartícula, tal como uma partícula de dicetopiperazina, e/ou aumenta  
15 a estabilidade estrutural da molécula do agente ativo.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos a seguir fazem parte do presente relatório e estão incluídos para demonstrar adicionalmente determinados aspectos dos exemplos descritos aqui. A invenção  
20 pode ser mais bem compreendida pela referência a um ou mais destes desenhos em combinação com a descrição detalhada das modalidades específicas presentes aqui.

As FIGs. 1A-1C apresentam os efeitos de caotrópicos e cosmotrópicos em curvas de carga para agentes ativos  
25 em micropartículas de fumaril dicetopiperazina (FDKP) como uma função de pH e 100 mM de agente cosmotrópico/caotrópico, de acordo com os ensinamentos da presente invenção. A FIG. 1A apresenta a carga de 0,75 mg/mL de insulina em 5 mg/mL de

micropartículas de FDKP na presença de caotrópicos e cosmotrópicos em pH 3,0-5,0. A FIG. 1B apresenta a carga de 0,25 mg/mL de peptídeo 1 do tipo glucagon (GLP-1) em 5 mg/mL de micropartículas de FDKP na presença de caotrópicos e cosmotrópicos em pH 2,0-4,0. A FIG. 1C apresenta a carga de 0,25 mg/mL de hormônio da paratireóide (PTH) em 5 mg/mL de micropartículas de FDKP na presença de caotrópicos fortes, NaSCN e NaClO<sub>4</sub>, entre pH 4,0-5,0.

As FIGs. 2A-2C apresentam os efeitos de osmólitos nas curvas de carga para agentes ativos em micropartículas de FDKP como uma função de pH e osmólitos (100 mM), de acordo com os ensinamentos da presente invenção. A FIG. 2A apresenta a carga de 0,75 mg/mL de insulina em 5 mg/mL de micropartículas de FDKP na presença de osmólitos em pH 3,0-5,0. A FIG. 2B apresenta a carga de 0,25 mg/mL de GLP-1 em 5 mg/mL de micropartículas de FDKP na presença de osmólitos entre pH 2,0-4,0. A FIG. 2C apresenta a carga de 0,10 mg/mL de peptídeo grelina em 5 mg/mL de micropartículas de FDKP na presença de osmólitos fortes em pH 4,0-5,0.

As FIGs. 3A-3D apresentam os efeitos de álcoois em curvas de carga para agentes ativos em micropartículas de FDKP como uma função de pH e álcoois, de acordo com os ensinamentos da presente invenção. A FIG. 3A apresenta a carga de 0,10 mg/mL de grelina em 5 mg/mL de micropartículas de FDKP na presença de hexafluorisopropanol (HFIP) a 5%, 10%, 15% e 20% v/v entre pH 2,0-4,0. A FIG. 3B apresenta a carga de 0,10 mg/mL de grelina em 5 mg/mL de micropartículas de FDKP na presença de trifluoretanol (TFE) a 5%, 10%, 15% e

20% v/v entre pH 2,0-4,0. As FIGs. 3C e 3D apresentam a carga de 0,25 mg/mL de GLP-1 em 5 mg/mL de micropartículas de FDKP em pH 2,0-5,0 na presença de HFIP e TFE, respectivamente.

5           As FIG. 4A-4D apresentam os efeitos do sal nas curvas de carga para agentes ativos em micropartículas de FDKP como uma função de pH e concentração de NaCl, de acordo com os ensinamentos da presente invenção. A FIG. 4A apresenta a carga de 0,75 mg/mL de insulina em 5 mg/mL de micropar-  
10   tículas de FDKP na presença de 0-500 mM de NaCl em pH 2,0-5,0. A FIG. 4B apresenta a carga de 0,25 mg/mL de GLP-1 em 5 mg/mL de micropartículas de FDKP na presença de 0-500 mM de NaCl em pH 2,0-5,0. A FIG. 4C apresenta a carga de 0,25 mg/mL de peptídeo PTH em 5 mg/mL de micropartículas de FDKP  
15   na presença de 0-1000 mM de NaCl em pH 2,0-5,0. A FIG. 4D apresenta a análise estrutural secundária de PTH em várias concentrações de sal (20°C). A far-UV CD de 4,3 mg/mL de PTH em pH 5,8 demonstra que à medida em que a concentração de NaCl aumenta, a estrutura secundária do peptídeo adota uma  
20   conformação mais helicoidal.

          As FIGs. 5A-5B apresentam a adsorção de moléculas hidrófobas em micropartículas, de acordo com os ensinamentos da presente invenção. A FIG. 5A apresenta a ligação de ciclosporina A a micropartículas de FDKP com anti-solvente (á-  
25   gua) em concentrações de 60%, 80% e 90%. A FIG. 5B apresenta a porcentagem de carga máxima teórica alcançada para ciclosporina A em relações mássicas variáveis de ciclosporina A/micropartículas de FDKP na presença de 90% de anti-

solvente.

A FIG. 6 apresenta a farmacocinética da única injeção intravenosa (IV) e insuflação pulmonar (IS) em ratos usando várias relações mássicas de ciclosporina  
5 A/micropartículas de FDKP a 90% de anti-solvente, de acordo com os ensinamentos da presente invenção.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

São descritos aqui métodos úteis para estabilizar agentes ativos farmacêuticos em combinação com micropartícu-  
10 las cristalinas. As composições resultantes fornecem agentes ativos estáveis, revestidos sobre as superfícies das micropartículas cristalinas.

A substância a ser revestida ou adsorvida sobre a micropartícula cristalina é referida aqui como agente ativo.  
15 Exemplos de classes de agentes ativos incluem composições farmacêuticas, compostos sintéticos e macromoléculas orgânicas que tem utilidade terapêutica, profilática, e/ou diagnóstica.

Geralmente, a maioria dos agentes ativos pode ser  
20 revestida ou adsorvida sobre a superfície da micropartícula cristalina incluindo, mas não limitados a, macromoléculas orgânicas, ácidos nucleicos, compostos orgânicos sintéticos, polipeptídeos, peptídeos, proteínas, polissacarídeos e outros açúcares, e lipídeos. Os peptídeos, proteínas e poli-  
25 peptídeos são cadeias de aminoácidos unidas por ligações de peptídeos. Os peptídeos são geralmente considerados como sendo menos do que 30 resíduos aminoácidos, mas podem incluir mais. As proteínas são polímeros que podem conter mais de

30 resíduos de aminoácidos. O termo polipeptídeo, como conhecido na técnica e usado aqui, pode referir-se a um peptídeo, uma proteína, ou qualquer outra cadeia de aminoácidos de qualquer comprimento contendo múltiplas ligações de peptídeos, embora contenham geralmente pelo menos 10 aminoácidos. Os agentes ativos usados na formulação de revestimento podem pertencer a uma variedade de classes de atividade biológica, tais como agentes vasoativos, agentes neuroativos, hormônios, anticoagulantes, agentes imunomoduladores, agentes citotóxicos, antibióticos, antivirais, antígenos e anticorpos.

Exemplos de agentes ativos que podem ser empregados na presente invenção incluem, de uma maneira não limitante: hormônio do crescimento, anticorpos e fragmentos do mesmo, alcinos, ciclosporinas (*por exemplo* ciclosporina A), PPACK (D-fenilalanil-L-prolil-L-arginina clorometil cetona), CMFDA (diacetato de 5-clorometilfluoresceína), Texas Red, clopidogrel, fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), peptídeo 1 do tipo glucagon (GLP-1), grelina, hormônio da paratireóide (PTH), insulina e análogos de insulina (*por exemplo* insulina asparte e insulina) e anticorpos e fragmentos dos mesmos, incluindo, mas não limitados a: anticorpos humanizados ou quiméricos; F(ab), F(ab)<sub>2</sub>, ou anticorpo de cadeia simples só ou fundido com outros polipeptídeos; anticorpos monoclonais diagnósticos ou terapêuticos para antígenos de câncer, citocinas, agentes infecciosos, mediadores inflamatórios, hormônios, e antígenos de superfície celular. Exemplos não limitantes de anticorpos para

antígenos do tumor incluem anti-SSX-241-49 (sarcoma sinovial, X breakpoint 2) anti-NY-ESO-1 (antígeno associado ao tumor esofágico), anti-PRAME (antígeno preferencialmente expresso de melanoma), anti-PSMA (antígeno de membrana da próstata específico), anti-Melan-A (antígeno associado ao tumor melanoma), anti-tirosinase (antígeno associado ao tumor melanoma) e anti-MOPC-21 (proteína celular plasmática do mieloma).

### Micropartículas

Essencialmente, o termo "micropartículas" refere-se a uma partícula com o diâmetro de cerca de 0,5-1000  $\mu\text{m}$ , independente da exata estrutura interior ou exterior. Dentro da ampla categoria de micropartículas, as "microesferas" referem-se a micropartículas com forma esférica uniforme. As micropartículas cristalinas, como referidas aqui, referem-se a micropartículas que têm a estrutura interna, embora não necessariamente a forma externa, de um cristal e têm um arranjo regular de átomos em uma estrutura espacial. As superfícies cristalinas ionizáveis referem-se a micropartículas cristalinas que têm a capacidade adicional de conduzir uma carga elétrica. Em algumas modalidades, a micropartícula pode ser um único cristal regularmente modelado. Em várias modalidades preferidas, a micropartícula é irregularmente modelada, é porosa, tem superfícies internas acessíveis a agentes ativos dissolvidos, ou compreendem cristais múltiplos, em qualquer combinação. Tais características, em geral, aumentarão a área superficial, aumentando, conseqüentemente, a capacidade de carga. Tais características podem

também contribuir com propriedades aerodinâmicas vantajosas, importantes se o agente ativo for distribuído pela inalação de um pó seco compreendendo as micropartículas.

Preferivelmente, a substância química que compõe a  
5 micropartícula cristalina é reversivelmente reativa com o agente ativo a ser distribuído, não-tóxica, bem como não-metabolizada por roedores e humanos. Apesar do dito anteriormente, alguns níveis de toxicidade são toleráveis, dependendo, por exemplo, da severidade da condição a ser tratada  
10 ou da quantidade de substância a qual o paciente está exposto. Similarmente, não é necessário que a substância seja completamente inerte metabolicamente. Ademais, a estrutura cristalina de micropartículas preferidas não é substancialmente rompida no processo de revestimento ou ligação com o  
15 agente ativo. A composição da micropartícula cristalina determina quais os tipos de interações químicas podem ser manipuladas para levar à adsorção de um agente ativo na superfície da micropartícula.

Uma variedade de substâncias pode ser usada para  
20 formar micropartículas cristalinas. Micropartículas, como tais, apresentam superfícies, as propriedades das quais podem ser manipuladas no processo de revestimento, conforme revelado no pedido de patente co-pendente U.S. \_\_\_\_/\_\_\_\_ (Attorney Docket No. 51300-00025), depositado no mesmo dia  
25 do presente pedido, e o pedido provisório norte-americano No. 60/717.524 depositado em 14 de setembro de 2005, cada qual incorporado aqui pela referência em sua totalidade. Os materiais representativos, a partir dos quais as micropartí-

culas podem ser formadas, incluem, mas não se limitam a, aminoácidos aromáticos ou compostos com solubilidade limitada em uma faixa de pH definida, tais como dicetopiperazinas e sulfatos de morfolina.

5 Um exemplo particular de micropartículas, como consideradas na presente invenção, são as micropartículas de dicetopiperazinas (DKP). Como discutido aqui, as micropartículas de DKP são empregadas para facilitar a adsorção do agente ativo. As patentes US 5.352.461 e US 5.503.802, cada  
10 qual incorporada aqui pela referência em sua totalidade, descrevem um sistema de distribuição de fármaco baseado na formação de micropartículas de dicetopiperazina (DKP) a partir de derivados de dicetopiperazina, tais como 3,6-bis[*N*-fumaril-*N*-(*n*-butil)amino] (também conhecido como fumaril dicetopiperazina ou FDKP; também referido como (E)-3,6-bis[4-  
15 (*N*-carbóxi-2-propenil)amidobutil]-2,5-dicetopiperazina) que são estáveis em pH baixo e dissolvem-se no pH do sangue ou do intestino delgado. Um sistema baseado em elementos estruturais de dicetopiperazina ou um de seus derivados de substituição, incluindo, mas não limitados a, dicetomorfolinas e  
20 dicetodioxanos, forma micropartículas com faixas de pH e distribuições de tamanho desejáveis, bem como com uma boa tolerância de carga. Uma ampla série de características reproduzíveis, estáveis pode ser gerada com manipulações apropriadas dos grupos substituintes. Essas patentes descrevem a  
25 precipitação da DKP na presença do agente ativo para formar micropartículas compreendendo o agente ativo. Detalhes adicionais com relação à síntese, precipitação e uso das dice-

topiperazinas estão descritos nas patentes US 6.071.497; 6.331.318; 6.428.771 e publicações das patentes norte-americanas Nos. 20060040953 e 20060041133, cada qual incorporada aqui por referência em sua totalidade. As composições compreendendo dicetopiperazina estão descritas na patente US 6.991.779 e na publicação da patente norte-americana No. 20040038865, cada qual incorporada por referência em sua totalidade.

Outras dicetopiperazinas consideradas na presente invenção incluem 3,6-di(4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(succinil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina (succinil dicetopiperazina ou SDKP); 3,6-di(maleil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(citraconil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(glutaril-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(malonil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(oxalil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina, e derivados dos mesmos. Os sais de dicetopiperazinas também podem ser usados na presente invenção e podem incluir, por exemplo, um sal farmaceuticamente aceitável, tal como Na, K, Li, Mg, Ca, amônio, ou mono-, di-, ou tri-alquilamônio (como derivados de trietilamina, butilamina, dietanolamina, trietanolamina ou piridinas, e semelhantes). O sal pode ser um sal mono, di ou misto. Sais de ordem mais elevada também são considerados para dicetopiperazinas, nos quais os grupos R contêm mais de um grupo ácido. Em outros aspectos da invenção, uma forma básica do agente pode ser misturada com dicetopiperazina para formar uma ligação de sal entre o fármaco e a dicetopiperazina, de tal forma

que o fármaco seja um contra-cátion da dicetopiperazina. Os sais de DKP para distribuição de fármacos estão descritos de forma mais detalhada na publicação da patente norte-americana No. 20060040953, a qual está incorporada aqui pela  
5 referência em sua totalidade.

As patentes US 6.444.226 e 6.652.885, cada qual incorporada aqui por referência em sua totalidade, descrevem a preparação e o fornecimento de micropartículas de DKP em suspensão aquosa, à qual uma solução de agente ativo é adi-  
10 cionada, e, então, a etapa crítica de liofilização da suspensão para produzir micropartículas com um revestimento de agente ativo. A base para esta formulação é que o revestimento de micropartícula com agente ativo é levado pela remoção do meio líquido através da liofilização (vide também a  
15 patente US 6.440.463, a qual está incorporada aqui pela referência em sua totalidade). Em contraste aos ensinamentos do estado da técnica, a presente invenção fornece um meio para ajustar a associação do agente ativo à micropartícula antes da remoção do solvente. Assim, a remoção do meio lí-  
20 quido por métodos físicos bulk (por exemplo filtração e sedimentação) ou métodos evaporativos (por exemplo liofilização e secagem por pulverização) podem resultar em comparáveis cargas.

#### Promovendo a Adsorção de Agentes Ativos

25 O agente ativo que é adsorvido na superfície de uma micropartícula cristalina pode envolver a alteração das propriedades do agente ativo em uma solução ou suspensão fluida sob várias condições de solução, promovendo, assim, a

adsorção na superfície da micropartícula e reduzindo a quantidade de agente ativo remanescente em solução. Alterações ou modificações no agente ativo podem ocorrer com o uso de modificadores, tais como, mas não limitados a, caotrópicos e cosmotrópicos, sais e orgânicos, tais como, mas não limitados a, álcoois, osmólitos e tensoativos. Esses modificadores podem agir no agente ativo para alterar seu potencial químico e, desta forma, sua estrutura, flexibilidade, rigidez ou estabilidade, sem alterar quimicamente o agente por si próprio. O termo "potencial químico" é bem conhecido por um técnico no assunto. Em modalidades da presente invenção, "potencial químico" refere-se à energia livre necessária para conduzir uma reação química, tal como, por exemplo, a interação entre um agente ativo e um solvente ou a adsorção do agente ativo em uma micropartícula. O termo "energeticamente favorável", como usado aqui, refere-se à diminuição dos níveis de energia livre dos estados absorvidos do agente ativo na micropartícula em relação ao nível de energia livre de micropartícula não revestida, ou agente ativo não ligado e/ou às formas insolúveis (incluindo agregação ou precipitação) do agente ativo. O termo "estrutura", como usado aqui, refere-se à estrutura secundária da molécula do agente ativo e inclui a formação alfa-helicoidal, folhas beta, ou espiral aleatória (desordenada) da molécula do agente ativo, tal como uma proteína. Adicionalmente, o termo estrutura pode incluir também estruturas terciárias e quaternárias da molécula, mas não está limitada a tais e pode referir-se também à auto-associação, agregação, multimerização, dimerização, e

semelhantes, de uma molécula. O termo "estabilidade", como usado aqui, refere-se à estabilização ou desestabilização da estrutura do agente ativo na presença do modificador.

Além disso, a alteração das propriedades do agente  
5 ativo em uma solução ou suspensão fluida afeta possivelmente as interações devido às propriedades hidrófobas, propriedades de ligação de hidrogênio e propriedades eletrostáticas do agente ativo e/ou micropartícula.

As interações hidrófobas são associações de grupos  
10 não-polares entre si em soluções aquosas devido à sua insolubilidade em água. As interações hidrófobas podem afetar vários processos moleculares incluindo, mas não limitados a, estabilização estrutural (de moléculas simples, complexos de duas ou três moléculas, ou conjuntos maiores) e dinâmica, e  
15 realiza contribuições importantes em processos de ligação ligante-proteína e proteína-proteína. Essas interações são também conhecidas por desempenharem um papel em eventos precoces de dobramento de proteínas, e estão envolvidas em fenômenos de montagem de complexos e automontagem (*por exemplo*, formação de membranas).  
20

As interações de ligação de hidrogênio são forças dipolo-dipolo especialmente fortes entre moléculas; um átomo de hidrogênio em uma ligação polar (*por exemplo*, H-F, H-O ou H-N) pode experimentar uma força atrativa com uma molécula  
25 ou íon eletronegativo da vizinhança que possui um par de elétrons não-compartilhado (tipicamente um átomo de F, O ou N em outra molécula). As ligações de hidrogênio são responsáveis pelas propriedades únicas da água e são muito importan-

tes na organização de moléculas biológicas, especialmente na influência de estrutura das proteínas e DNA.

As interações eletrostáticas são atrações entre cargas opostas ou repulsões entre cargas semelhantes que crescem conforme as cargas se aproximam umas das outras. As interações eletrostáticas constituem um componente-chave no entendimento das interações entre corpos carregados em soluções iônicas. Por exemplo, a estabilidade de partículas coloidais, dispersas em um solvente, pode ser explicada levando em consideração a competição entre interações eletrostáticas repulsivas e as interações de van der Waals atrativas. As interações eletrostáticas também têm importância ao levar-se em conta a interação e a adesão entre partículas.

#### Sais

Em algumas modalidades da presente invenção, as propriedades do agente ativo são alteradas usando um sal, tal como, mas não limitado a, cloreto de sódio. Os agentes ativos, por exemplo, PTH e GLP-1, são submetidos a mudanças estruturais notáveis na presença de sal. Conforme mostrado no Exemplo 5 (FIG. 4D), a presença de sal aumenta a estrutura secundária do PTH através da promoção de uma conformação mais helicoidal do peptídeo. O sal também mostrou afetar a estrutura do GLP-1, conforme descrito no pedido de patente norte-americano sob No. de série 60/744,882, depositado em 14 de abril de 2006 e incorporado aqui pela referência em sua totalidade. Além disso, sais e outros compostos iônicos são capazes de estabilizar ou desestabilizar proteínas e peptídeos, especialmente quando a diferença entre o pH da

solução e o pI da proteína ou peptídeo aumenta pela ligação a resíduos especificamente carregados (Antosiewicz J, et al., *J. Mol. Biol.* 238:415-436, 1994).

#### Caotrópicos

5 Os caotrópicos, como conhecidos no estado da técnica, são íons que apresentam fracas interações com a água e, portanto, desestabilizam moléculas, como proteínas e peptídeos. Esses compostos quebram a rede de ligação de hidrogênio da água e diminuem sua tensão superficial, promovendo,  
10 assim, liberdade mais estrutural e a desnaturação de proteínas e peptídeos. Exemplos de caotrópicos incluem, mas não estão limitados a, NaSCN,  $(\text{CH}_3)_3\text{N-HCL}$ ,  $\text{Na}_2\text{NO}_3$ , e  $\text{NaClO}_4$  e cloreto de cério ( $\text{CsCl}$ ).

Os cosmotrópicos ou liotrópicos, por outro lado,  
15 são íons que apresentam fortes interações com a água e, geralmente, estabilizam macromoléculas, tais como proteínas e peptídeos. Esse efeito de estabilização é ocasionado pelo aumento da ordem da água e pelo aumento de sua tensão superficial. Exemplos de cosmotrópicos incluem, mas não estão li-  
20 mitados a, citrato de sódio (Citrato Na) e sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

#### Álcoois

Outra classe de modificador de agente ativo utilizada na presente invenção trata-se de álcoois. Os álcoois  
25 são capazes de romper a estrutura nativa de proteínas e peptídeos e também são capazes de estabilizar e induzir conformações  $\alpha$ -helicoidais em macromoléculas, mais notavelmente dentro de proteínas e polipeptídeos desestruturados. Tais

álcoois podem incluir, mas não estão limitados a, metanol (MeOH), etanol (EtOH), trifluoretanol (TFE) e hexafluoropropanol (HFIP). Dentre esses, o TFE e o HFIP são os álcoois mais potentes para induzir transições helicoidais em peptídeos e proteínas (Hirota et al., *Protein Sci.*, 6:416-421; 1997, incorporado aqui pela referência a todo seu conteúdo com relação a transições helicoidais em peptídeos e proteínas). Esses álcoois podem afetar a estrutura das proteínas e dos peptídeos pela sua habilidade em romper as propriedades de ligação de hidrogênio do solvente (vide Eggers e Valentine, *Protein Sci.*, 10:250-261; 2001, incorporado aqui pela referência a todo seu conteúdo com relação aos efeitos dos álcoois sobre a estrutura das proteínas).

#### Osmólitos

Outra classe de modificadores que afeta a afinidade do agente ativo com a micropartícula trata-se de osmólitos. Os osmólitos, como conhecido por um técnico no assunto, são compostos pequenos que são produzidos pelas células de quase todos os organismos sob situações de estresse elevado (tais como flutuações extremas de temperatura, ambientes elevados de sal, etc.) para estabilizar suas macromoléculas. Eles não interagem diretamente com a macromolécula, mas agem alterando as propriedades do solvente no meio celular e, assim, sua presença modifica indiretamente a estabilidade das proteínas. Esses compostos incluem vários polióis, açúcares, polissacarídeos, solvente orgânicos, e vários aminoácidos e seus derivados. Embora o mecanismo dos osmólitos não esteja ainda bem elucidado, especula-se que esses compostos agem

possivelmente através do aumento do potencial químico estado desnaturado relativo ao estado nativo, aumentando, portanto, a (positiva) diferença de energia de Gibbs ( $\Delta G$ ) entre conjuntos desnaturados e nativos (Arakawa e Timasheff, *Biochemistry* 29:1914-1923; 1990).

Os osmólitos, considerados na presente invenção, incluem, de maneira não limitante, hexileno-glicol (Hex-Gli), trealose, glicina, poli(etileno glicol) (PEG), N-óxido de trimetilamina (TMAO), manitol e prolina.

#### 10        Descrição Geral do Método

Nos métodos da presente invenção, pelo menos três componentes são combinados em um meio líquido: pelo menos um agente ativo, micropartículas (pré-formadas) e pelo menos um modificador de agente ativo, conforme descrito anteriormente. Os componentes desse sistema podem ser combinados em qualquer ordem. Em algumas modalidades, o modificador e o agente ativo são combinados entre si, antes da mistura ser combinada com uma suspensão de micropartículas. Em outras modalidades, o agente ativo e as micropartículas são primeiramente combinados e, em seguida, o modificador é adicionado. Em algumas modalidades, o agente ativo, ou o modificador, é fornecido e combinado com outro componente, ou componentes, como uma solução. Em outras modalidades, quaisquer dentre os componentes podem ser fornecidos em forma sólida e dissolvidos, ou, no caso das micropartículas, suspensos no meio líquido contendo outro dentre os componentes. Variações adicionais são aparentes para um técnico no assunto.

As micropartículas são formadas antes de serem

combinadas com os outros componentes do sistema, e, como tal, estão presentes como uma suspensão. Apesar disso, o meio líquido, no qual as micropartículas estão suspensas, é, algumas vezes, referido aqui como um solvente. O meio líquido utilizado no método é quase sempre aquoso. No entanto, em alguns casos, o meio líquido pode compreender mais de um composto orgânico, por exemplo, um álcool usado como um modificador, than it does water.

Após a montagem de todos os componentes do sistema, o agente ativo será adsorvido na superfície da micropartícula. Em modalidades reforçadamente preferidas da presente invenção, pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95%, ou substancialmente todo o agente ativo no sistema será adsorvido nas micropartículas, até 100%. Em algumas modalidades da presente invenção, a área superficial acessível das micropartículas será suficiente para todo o agente ativo adsorvido estar em contato direto com a superfície da micropartícula, isto é, o revestimento é uma monocamada. No entanto, deve ser entendido que interações adicionais podem estar presentes. Em alguns casos, por exemplo, a auto-associação do agente ativo pode ser também energeticamente favorecida, de forma que múltiplas camadas do agente ativo revistam a partícula. Não é necessário que quaisquer dessas camadas estejam completas ou que a espessura do revestimento seja uniforme. Duas formas de auto-associação podem ser reconhecidas: multimerização e agregação. A multimerização é caracterizada por interações intermoleculares específicas e estequiometria fixa. A agregação é caracterizada por interações intermoleculares

não-específicas e estequiometria indefinida. Deve ser entendido que agentes ativos multiméricos podem ser adsorvidos no estado multimérico, ou dissociados em monômeros, ou multímeros de ordem mais baixa, e adsorvidos na superfície nesse  
5 estado. Em qualquer caso, a agregação pode mediar a formação de camadas do agente ativo na micropartícula.

As micropartículas carregadas constituem uma composição de distribuição de fármaco que pode ser utilizada em uma variedade de formas. As partículas podem ser usadas como  
10 pós, em formas de dosagem sólidas, tais como comprimidos ou contidas em cápsulas, ou suspensas em um veículo líquido. Geralmente, isso irá requerer troca e/ou remoção do meio líquido, no qual a carga está presente. Isso pode ser realizado por qualquer dentre uma variedade de meios incluindo métodos físicos, tais como, mas não limitados a, sedimentação  
15 e filtração, e métodos evaporativos, tais como, mas não limitados a, liofilização ou secagem por pulverização. Essas técnicas são conhecidas por técnicos no assunto. Em uma modalidade da presente invenção, o solvente é removido através da secagem por pulverização. Métodos de secagem por pulverização de micropartículas de dicetopiperazina estão descritos, por exemplo, no pedido de patente provisório norte-americano No. 60/776.605, depositado em 22 de fevereiro de 2006, incorporado aqui por referência para todo seu conteúdo  
20 relacionado à secagem por pulverização de micropartículas de dicetopiperazina.  
25

Se a carga não estiver substancialmente completa, modalidades da invenção, ao usar-se métodos físicos para re-

moção de solvente irá ocorrer, tipicamente, uma perda do agente ativo não-adsorvido, mas pode, por exemplo, ser útil para assegurar que o revestimento não irá progredir além de uma monocamada. Contrariamente, modalidades usando secagem evaporativa para remoção de solvente pode, em alguns casos, depositar mais agente ativo na partícula, evitando, assim, sua perda, mas as interações de adsorção envolvidas podem diferir daquelas estabelecidas pelas ligações de moléculas nas etapas precedentes do método. Em outras modalidades, a remoção evaporativa do solvente não resulta em deposições adicionais significativas de agente ativo, incluindo o caso em que substancialmente todo o agente ativo já tenha sido adsorvido na partícula.

#### EXEMPLOS

Os exemplos a seguir estão incluídos para demonstrar modalidades preferidas da presente invenção. Deve ser apreciado por técnicos no assunto que as técnicas, descritas nos exemplos que seguem, representam técnicas descobertas pelo inventor para funcionarem bem na prática da invenção, e, assim, podem ser consideradas por constituírem modos preferidos para sua prática. Enquanto a discussão foca em um mecanismo particular, deve ser entendido que alguns modificadores podem apresentar efeitos múltiplos sobre o agente ativo, ou, de fato, na superfície da partícula, cada qual podendo contribuir para promover a adsorção do agente ativo na partícula. No entanto, técnicos no assunto, levando em conta a presente invenção, irão apreciar que várias modificações podem ser feitas nas modalidades específicas que es-

tão descritas e, ainda assim, um resultado similar ou parecido será obtido sem fugir ao princípio e escopo da invenção.

#### EXEMPLO 1

##### 5        Procedimento Experimental: Estudos de Adsorção de Agente Ativo/Micropartícula de FDKP

Os agente ativos insulina, PTH, grelina e GLP-1 foram comprados da American Peptide (Sunnyvale, CA) ou AnaSpec (San Jose, CA), ou foram preparados em casa (MannKind Corporation, Valencia, CA). Amostras aquosas em pH variáveis e a 20°C (a menos que observado de outra maneira) foram analisadas. As amostras foram, em geral, preparadas na hora e foram misturadas com o aditivo particular (*por exemplo* sal, tampão de pH, etc., se qualquer) antes da adição das micro-  
15        partículas de FDKP.

A associação do agente ativo a partículas de dicetopiperazina (DKP) em suspensão foi avaliada pela condução de estudos de adsorção. Os parâmetros investigados nos estudos de adsorção exploraram os efeitos das interações eletrostáticas, ligação de hidrogênio, estrutura da água, flexibilidade da proteína e interações de pareamento de sais específicas na interação agente ativo/micropartícula de fumaril dicetopiperazina (FDKP). Além disso, uma série de estabilizadores de proteínas comuns foi testada pela interferência na adsorção do agente ativo em superfícies de micro-  
20        partículas de FDKP.  
25        partículas de FDKP.

Várias condições de promoção da adsorção do agente ativo nas superfícies de partículas de FDKP pré-formadas fo-

ram estudadas. Uma suspensão de micropartículas de FDKP de 15 mg/mL foi combinada com 3X de tampão de pH e 3X de solução de um aditivo ou excipiente. A solução final continha uma concentração de micropartículas de FDKP de 5 mg/mL e uma  
5 concentração de GLP-1 de 0,25 mg/mL (5% p/p), ou uma concentração de PTH de 0,25 mg/mL (5% p/p), ou uma concentração de insulina de 0,75 mg/mL (15% p/p) ou uma concentração de grelina de 0,10 mg/mL (2% p/p). O agente ativo não-ligado no sobrenadante foi removido da suspensão por filtração. As  
10 partículas de FDKP com o agente ativo associado foram dissolvidos (reconstituídos) em 100 mM de bicarbonato de amônio, e filtrado para separar (dividir) quaisquer moléculas de agente ativo agregadas.

#### EXEMPLO 2

#### 15 Efeito de Caotrópicos e Cosmotrópicos na Adsorção de Agente Ativo em Partículas de FDKP

As espécies iônicas que afetam a estrutura da água e proteínas (caotrópicos e cosmotrópicos) foram estudadas para investigar a adsorção de agente ativo em uma superfície  
20 de micropartícula de FDKP por um mecanismo hidrófobo (em pH baixo). A carga de agente ativo em partículas de FDKP foi realizada em 5 mg/mL de micropartículas e uma concentração de GLP-1 de 0,25 mg/mL (5% p/p), ou uma concentração de 0,25 mg/mL de PTH (5% p/p), ou uma concentração de insulina de  
25 0,75 mg/mL (15% p/p). A concentração do caotrópico ou cosmotrópico nas amostras foi mantida constante a 100 mM e o pH foi variado de 2,0 a 5,0. Os caotrópicos ou cosmotrópicos foram selecionados dentre os seguintes: NaSCN, CsCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

$(\text{CH}_3)_3\text{N-HCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{NO}_3$ , Citrato Na e  $\text{NaClO}_4$ . O controle indica que nenhum caotrópico ou cosmotrópico foi adicionado.

As FIGs. 1A-1C apresentam, respectivamente, as curvas de carga para insulina, GLP-1 e PTH na superfície da micropartícula de FDKP como uma função de pH na presença de  
5 vários caotrópicos ou cosmotrópicos. Em pH baixo (3,0), todos os caotrópicos e cosmotrópicos analisados melhoraram a afinidade da insulina com a superfície da micropartícula e mostraram uma carga significativa comparada com o controle.  
10 Em pH 4, esse efeito não foi observado (FIG. 1A). Em pH mais elevado (5,0), os caotrópicos e cosmotrópicos interferiram na adsorção de insulina na superfície da micropartícula, comparada com o controle, pela precipitação da proteína insulina. Desta forma, esses agentes promoveram a ligação da  
15 insulina às partículas de FDKP em pH mais baixo, mas possuem um efeito mínimo ou detrimental em condições de pH mais elevado.

O GLP-1, na presença de caotrópicos e cosmotrópicos, apresentou uma afinidade melhorada com micropartículas  
20 de FDKP em pH 2,0-4,0 com um efeito maior em pH mais baixo (FIG. 1B). Observações similares foram reveladas no pedido provisório norte-americano No. de série 60/744.882. Neste, observou-se que aproximadamente 0,02-0,04 mg/mL do peptídeo GLP-1 (que corresponde a relações mássicas de 0,004 a 0,008)  
25 foi detectado nas amostras de controle livre de micropartículas reconstituídas na presença de  $\text{NaSCN}$ ,  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{NO}_3$  e Citrato Na, indicando que uma pequena proporção do GLP-1 precipitou de modo preferível a ser adsorvida na par-

tícula.

A afinidade de PTH com a superfície da micropartícula de FDKP foi maior em pH de 4,0 a cerca de 4,5 na presença dos caotrópicos fortes NaSCN e NaClO<sub>4</sub> (FIG. 1C).

5 Os dados sustentam que os agentes caotrópicos e cosmotrópicos desempenham um papel importante na promoção da adsorção do agente ativo em superfícies de micropartículas de FDKP, mais notavelmente em pH baixo. Uma vez que esses modificadores possuem um efeito maior em pH baixo, onde a  
10 superfície da micropartícula é menos iônica, é mais provável que a adsorção resulte de um mecanismo hidrófobo. A diminuição da adsorção observada em pH mais elevado pode resultar da superfície mais carregada da partícula em combinação com os efeitos que os agentes caotrópicos e cosmotrópicos possu-  
15 em de aumentar a hidrofobicidade dos agentes ativos. Ademais, como espécies iônicas, esses agentes podem competir com o agente ativo na ligação com a micropartícula, ou romper as interações eletrostáticas entre o agente ativo e a micropartícula. Finalmente, observa-se também que a blindagem de Debye pode contribuir para a diminuição da adsorção  
20 em superfícies mais carregadas.

### EXEMPLO 3

#### Efeito de Osmólitos na Adsorção de Agente Ativo em Partículas de FDKP

25 Para avaliar a importância da estabilidade do agente ativo na adsorção, o efeito de osmólitos nas ligações do agente ativo a partículas de FDKP foi examinado por análise HPLC. As FIG. 2A-2C mostram as curvas de carga para in-

5 sulina (FIG. 2A), GLP-1 (FIG. 2B) e grelina (FIG. 2C) em partículas de FDKP como uma função de pH na presença de estabilizadores comuns (osmólitos). A carga do agente ativo em micropartículas de FDKP foi realizada a 5 mg/mL de micropar-  
tículas e uma concentração de insulina de 0,75 mg/mL (15% p/p), ou uma concentração de GLP-1 de 0,25 mg/mL (5% p/p) ou uma concentração de grelina de 0,10 mg/mL (2% p/p). A concentração do osmólito (estabilizador) nas amostras foi man-  
tida constante em 100 mM e o pH variou de cerca de 2,0 a  
10 cerca de 5,0. Os osmólitos foram selecionados a partir de hexileno-glicol (Hex-Gli), trealose, glicina, PEG, TMAO, manitol e prolina; o controle indica nenhum osmólito.

Dentre os agentes ativos estudados, a insulina mostrou uma afinidade significativamente melhorada com a su-  
15 perfície da partícula de FDKP na presença de osmólitos (PEG, glicina, trealose, manitol e Hex-Gli) em uma faixa de pH de 3,0 a 5,0 (FIG. 2A). Dentre os osmólitos estudados, PEG e a prolina melhoraram a afinidade para a adsorção de GLP-1 na superfície da partícula de FDKP numa faixa de pH de 2,0 a  
20 4,0. O osmólito TMAO foi mais eficaz que o PEG ou a prolina na ligação de GLP-1 à superfície da micropartícula de FDKP em pH baixo (2,0), porém foi modestamente mais detrimental em pH 3,0 e acima (FIG. 2B). A grelina, no entanto, mostrou uma maior afinidade com a superfície da micropartícula na  
25 presença de 100 mM de manitol, PEG, glicina, Hex-Gli e trealose, quando comparada com o controle numa faixa de pH de cerca de 4,0 a 5,0 (FIG. 2C).

Essas curvas de carga sugeriram que os osmólitos

são capazes de aumentar a adsorção do agente ativo na superfície da micropartícula de FDKP. É provável que esse efeito resulte da habilidade dos modificadores em estabilizar o agente ativo, o que possibilitou uma adsorção mais energeticamente favorável.

#### EXEMPLO 4

##### Efeito de Álcoois na Afinidade do Agente Ativo com Partículas de FDKP

Ao avaliar o efeito de modificadores sobre o agente ativo que permite a adsorção na superfície da micropartícula por um mecanismo hidrófobo, o efeito dos álcoois foi examinado. Os álcoois, conhecidos por induzirem uma conformação helicoidal em peptídeos e proteínas desestruturados pelo aumento da força de ligação de hidrogênio, foram avaliados para determinar o papel que a conformação helicoidal desempenha na adsorção do agente ativo na superfície da partícula de FDKP. Os agentes ativos, tais como, GLP-1 e grelina, foram analisados. A carga do agente ativo em partículas de FDKP foi realizada a 5 mg/mL de micropartículas e uma concentração de GLP-1 de 0,25 mg/mL (5% p/p) ou uma concentração de grelina de 0,10 mg/mL (2% p/p). O efeito de cada álcool foi observado numa faixa de pH de 2,0 a 5,0. Os álcoois usados foram trifluoretanol (TFE) e hexafluorisopropanol (HFIP). Cada álcool foi avaliado em concentrações variáveis que incluem 5%, 10%, 15% ou 20% v/v.

As FIG. 3A-3D mostram as curvas de carga para o agente ativo em micropartículas de FDKP como uma função de pH para cada álcool e cada agente ativo. Em pH 2,0-4,0, a

grelina apresentou uma afinidade extremamente melhorada com a superfície da micropartícula na presença de HFIP e TFE em todas as concentrações testadas (5%, 10%, 15% e 20%), como demonstrado pela razão mássica de grelina para partículas de FDKP (FIGs. 3A-3B).

Em pH 2,0-5,0, o GLP-1 apresentou uma afinidade melhorada com a superfície da micropartícula na presença de HFIP e TFE nas concentrações mostradas (5% e 10%) (FIG. 3C-3D). O efeito do TFE foi menos acentuado, e, em pHs mais baixos testados, foi detrimental. Foi observado que uma quantidade substancial do peptídeo GLP-1 (0,13-0,19 mg/mL, que corresponde a relações mássicas de 0,026 a 0,038) foi detectada nas amostras de controle livres de micropartículas reconstituídas na presença de 10% de HFIP e TFE em pH 4,0, indicando que parte do GLP-1 havia precipitado. No entanto, em pH baixo (2,0-3,0), a quantidade de peptídeo GLP-1 detectado no controle livre de micropartículas reconstituídas na presença de 10% de HFIP e TFE foi significativamente diminuída. Em pH 3,0, o peptídeo GLP-1 a 0-0,02 mg/mL (que corresponde a uma razão mássica de 0 a 0,004) foi detectado, ao passo que nenhum GLP-1 foi detectado nas amostras de controle em pH 2,0. As relações mássicas nas FIGs. 3C-3D refletem ambos agente ativo precipitado e adsorvido, embora a precipitação se torne um componente reforçadamente muito menor à medida que o pH diminui para 3,0.

Os dados indicam que os álcoois são capazes de melhorar a adsorção do agente ativo em micropartículas de FDKP. O aumento na adsorção resultou, provavelmente, de in-

terações hidrófobas intensificadas entre o agente ativo e a superfície da micropartícula na presença de álcoois.

#### EXEMPLO 5

##### Efeito do Sal na Adsorção do Agente Ativo em Par-

##### tículas de FDKP

Para tentar entender o mecanismo hidrófobo de ligação, os efeitos do sal na adsorção do agente ativo em micropartículas de FDKP foram observados através da análise HPLC.

A carga do agente ativo em micropartículas de FDKP foi realizada a 5 mg/mL de micropartículas e uma concentração de insulina de 0,75 mg/mL (15% p/p), ou uma concentração de GLP-1 de 0,25 mg/mL (5% p/p) ou uma concentração de PTH de 0,25 mg/mL (5% p/p) na presença de 0, 25, 50, 100, 250 e 500 mM de NaCl (FIGs. 4A-4C). A carga de PTH em partículas de FDKP também foi avaliada em 1000 mM de NaCl. A quantidade de agente ativo detectado nas amostras de controle livres de micropartículas reconstituídas, como uma função de pH e concentração de NaCl, foi avaliada. O pH foi controlado com uma mistura de 20 mM de fosfato de potássio/20 mM de acetato de potássio.

Conforme observado na FIG. 4A, a ligação (adsorção) aumentada da insulina a partículas de FDKP estava evidente em altas concentrações de sal de 100-500 mM em pH de cerca de 2,5 a cerca de 3,5. Em um pH entre cerca de 4,0 e cerca de 5,0, para todas as concentrações de sal testadas, uma redução na adsorção de insulina na partícula de FDKP foi observada.

Em um pH de cerca de 2,0 a cerca de 3,5, a ligação (adsorção) aumentada de GLP-1 a partículas de FDKP estava evidente para todas as concentrações de sal testadas (FIG. 4B). Em pH 4,0 e acima, a redução da ligação também foi observada.

Estudos similares usando PTH como agente ativo mostraram uma ligação aumentada de PTH a partículas de FDKP em concentrações elevadas de sal de 250 a 1000 mM em pH de cerca de 2,0 a cerca de 3,5 (FIG. 4C). Em pH de cerca de 3,5 a cerca de 5,0, a ligação de PTH à micropartícula diminuiu na presença do sal.

Em pH baixo, onde a adsorção não é favorável, a adição de sal foi capaz de modificar o potencial químico do agente ativo, de modo a aumentar sua afinidade com a superfície da micropartícula. Tal melhora de ligação resultou, provavelmente, do mecanismo hidrófobo. Além disso, os dados indicam que, à medida que o pH foi aumentando, a adsorção diminuiu com a concentração de sal aumentada. À medida que a superfície da micropartícula tornou-se mais carregada aumentando o pH, o mecanismo hidrófobo hipotético pode ser esperado como sendo menos eficaz na promoção da adsorção do agente ativo. Essa redução pode ter resultado também da competição do sal pelos sítios de ligação na superfície da micropartícula. Foi observado que a blindagem de Debye pode ter contribuído também para a adsorção reduzida observada.

Os dados mostraram também que o sal é capaz de alterar a estrutura dos agentes ativos. Por exemplo, medidas de dicroísmo circular com PTH mostraram que, à medida que a

concentração de sal aumentou, a estrutura secundária do peptídeo adotou uma conformação mais helicoidal (FIG. 4D). Isso sugere que uma mudança na estrutura do PTH pode promover sua ligação à superfície da micropartícula em pH baixo.

5           Em uma solução aquosa, a presença do sal também foi mostrada para dividir o corante Texas Red na superfície da micropartícula.

#### EXEMPLO 6

#### Efeitos na Adsorção de Ciclosporina A em Partículas de FDKP

10           Os efeitos na adsorção de moléculas pequenas hidrófobas em partículas de FDKP foram investigados tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, usando ciclosporina A como o agente ativo. A adsorção foi promovida pela alteração da solubilidade do agente ativo.

15           A ciclosporina A, um polipeptídeo cíclico lipofílico, foi estudada com o intuito de mostrar como uma molécula pode ser adsorvida em micropartículas. Ademais, o tamanho da ciclosporina A (1202,61 MW) foi utilizado para demonstrar as capacidades de carga das micropartículas para compostos menores.

20           Para realizar a carga, um método solvente/anti-solvente foi utilizado. O princípio básico dessa metodologia é dissolver o composto em um solvente (metanol) e, em seguida, usar um anti-solvente (água) para conduzir o composto para fora da solução e para a superfície das micropartículas. Utilizando esse método solvente/anti-solvente, a ciclosporina A foi carregada com êxito na superfície das mi-

cropartículas.

Em um experimento preliminar para determinar um perfil de solubilidade, a ciclosporina A foi dissolvida a 10 mg/mL em metanol e sua solubilidade a 1 mg/mL com concentrações variáveis de anti-solvente (10-90% de H<sub>2</sub>O em 10% de incrementos) foi analisada por HPLC. As áreas de pico da ciclosporina A foram comparadas com a amostra contendo apenas metanol para determinar a porcentagem de perda para precipitação. Foi observado que a solubilidade foi, em alto grau, retida abaixo de 60% de H<sub>2</sub>O. Em 70% de H<sub>2</sub>O, uma significativa maior parte de agente estava insolúvel e em 80-90% de H<sub>2</sub>O menos de 5% de solubilidade remanescente.

Para avaliar a carga da partícula, micropartículas de FDKP foram suspensas em soluções de metanol de ciclosporina A. Água foi, então, adicionada em uma etapa particular para concentrações finais de 60, 80 e 90%. Metade da amostra foi pelletizada e a outra metade foi liofilizada. Cada metade foi, então, redissolvida, de tal forma que as porcentagens finais foram de 20% de micropartículas de FDKP/ciclosporina A, 20% de 0,5 M de bicarbonato de amônio (AmBicard) e 60% de metanol (as concentrações necessárias para a dissolução de ambas micropartícula e ciclosporina A). O teor de ciclosporina A de cada foi analisada por HPLC e comparada para determinar a proporção que foi adsorvida na partícula. Os resultados estão presentes na FIG. 5A. Em 60% de H<sub>2</sub>O foi observado que 20% da ciclosporina A havia se ligado a partícula. Em 80% e 90% de H<sub>2</sub>O, as cargas eram de cerca de 90% e 95%, respectivamente, indicando a forte ligação da ciclospo-

rina A às micropartículas de FDKP.

A capacidade de carga das micropartículas para ciclosporina A foi analisada no nível de 90% de anti-solvente pela variação da carga de entrada da ciclosporina A, de modo  
5 que o teor final dos sólidos recuperados fosse de 2% a 20%, assumindo que toda a ciclosporina A tivesse sido adsorvida. Foi observado que, à medida que a carga de entrada aumentou sobre essa faixa, a porcentagem de ciclosporina A disponível, ligada à micropartícula aumentou de 50% a 95% da carga  
10 de entrada (FIG. 5B). Deve ser notado, levando-se em conta que a solubilidade da ciclosporina A é de 0,05 mg/mL em 90% de água, que esses resultados indicaram que substancialmente toda a ciclosporina A insolúvel foi adsorvida nas partículas de modo preferível a precipitação.

15

#### EXEMPLO 7

#### Insuflação Pulmonar de Ciclosporina A/Partículas de FDKP

Para examinar a farmacocinética de ciclosporina A/micropartículas de FDKP, concentrações plasmáticas de ciclosporina A foram avaliadas em fêmeas de ratos *Sprague Dawley* administrando várias formulações de ciclosporina A/micropartículas de FDKP via insuflação pulmonar ou injeção intravenosa. Esses estudos foram conduzidos usando ciclosporina A/micropartículas de FDKP preparadas em 90% de anti-  
20 solvente e uma razão mássica máxima teórica de 0,05; 0,10 ou 0,20; conforme descrito no exemplo acima. Essas são referidas como as cargas de 5%, 10% e 20%.

25

Uma dose única de 2,5 mg de ciclosporina

A/micropartículas de FDKP foi distribuída para oito grupos de ratos via insuflação pulmonar ou injeção intravenosa. Amostras de sangue foram tiradas no dia da dosagem para cada grupo na pré-dosagem (0 mg), e 5, 20, 40, 60, 240, 480 minutos e 24 horas pós-dosagem. A cada instante de tempo, aproximadamente 100 µL de sangue total foram coletados da veia lateral da cauda em um criovial, invertido e congelado. As amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 rpm e aproximadamente 40 µL foram pipetados em 96 placas com cavidades, as quais foram armazenadas a -80°C até que fossem analisadas.

Conforme mostrado na FIG. 6, a administração de 2,5 mg de micropartículas de FDKP/ciclosporina A via insuflação pulmonar resultou em níveis máximos de ciclosporina no soro, 24 horas pós-dosagem, nas fêmeas de ratos *Sprague Dawley*. A carga de 10% alcançou uma Cmax de 32,4 ng/mL naquele instante de tempo. Animais administrados com 2,5 mg de micropartículas de FDKP/ciclosporina A em 0,1 mL via injeção intravenosa mostrou níveis mínimos de ciclosporina fora 24 horas pós-dosagem. Foi observado que os níveis de micropartículas de FDKP atingiram um pico em 20 minutos pós-dosagem, e retornaram aos níveis da linha de base em 4 horas para ambos os grupos insuflação pulmonar e injeção intravenosa.

Como um todo, os dados mostram a biodisponibilidade de ciclosporina A/micropartícula de FDKP. Foi observado que o único pico em 240 minutos trata-se de uma anomalia. Para todos os animais testados, a patologia, conforme determinada por observação geral e microscópica, estava normal.

A menos que indicado de outra forma, todos os nú-

meros indicando quantidades de ingredientes, propriedades como peso molecular, condições de reação, e etc. usados no relatório descritivo e nas reivindicações devem ser interpretados como sendo modificados a todo instante pelo termo "cerca de". Conseqüentemente, a menos que indicado de outra maneira, os parâmetros numéricos estabelecidos no relatório e nas reivindicações em anexo são aproximações que podem variar, dependendo das propriedades desejadas visadas de modo a serem obtidas pela presente invenção. Não menos que e provavelmente muito mais, e não como uma tentativa de limitar o pedido da doutrina de equivalentes do escopo das reivindicações, cada parâmetro numérico deve ser ao menos interpretado considerando o número de dígitos significativos reportados e pela aplicação de técnicas de arredondamento usuais. Apesar das faixas e parâmetros numéricos que estabelecem o amplo escopo da invenção serem aproximações, os valores numéricos estabelecidos nos exemplos específicos estão tão precisamente reportados, quanto possível. Qualquer valor numérico, no entanto, contém inerentemente determinados erros, resultando essencialmente de desvios padrões encontrados em suas respectivas medições de teste.

Os termos "um" e "uma" e "o/a" e referências similares usadas no contexto da descrição da invenção (especialmente no contexto das reivindicações que seguem) são para serem entendidas abrangendo ambos singular e plural, a menos que indicado aqui de outra forma ou claramente contradito pelo contexto. A citação, aqui, de faixas de valores é pretendida meramente como um método simples e rápido de refe-

referir-se a cada valor em separado dentro da faixa. A menos que indicado aqui de outra maneira, cada valor individual está incorporado no relatório descritivo como se ele estivesse individualmente citado aqui. Todos os métodos descritos podem ser realizados em qualquer ordem desejada, a menos que indicado aqui de outra forma ou claramente contradito pelo contexto. O uso de quaisquer ou todos os exemplos, ou linguagens exemplares (*por exemplo* "tal como"), fornecidos aqui é pretendido meramente para tornar mais clara a invenção e não causar uma limitação no escopo da invenção, a menos que indicado. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada como indicativo de qualquer elemento essencial não-reivindicado pela prática da invenção.

O uso do termo "ou" nas reivindicações é usado como significado para "e/ou", a menos que claramente indicado para referir-se a alternativas apenas ou as alternativas serem mutuamente exclusivas; embora a descrição suporte uma definição que se refere a apenas alternativas e "e/ou".

Os grupamentos de elementos alternativos ou modalidades da invenção, descritos aqui, não devem ser entendidos como limitações. Cada membro do grupo deve referir-se a e reivindicado individualmente ou em qualquer combinação com outros membros do grupo ou outros elementos encontrados aqui. Antecipa-se que um ou mais membros de um grupo podem estar incluídos em, ou retirados de, um grupo por razões de conveniência e/ou de patenteabilidade. Quando qualquer inclusão ou retirada ocorre, o relatório é aqui considerado contendo o grupo conforme modificado, fornecendo, assim, a

descrição por escrito de todos os grupos da fórmula Markush usados nas reivindicações em anexo.

Modalidades preferidas dessa invenção são descritas aqui, incluindo o melhor modo conhecido pelos inventores para realizar a invenção. Certamente, variações nessas modalidades preferidas se tornarão evidentes para técnicos no assunto, ao lerem a descrição acima. O inventor conta com técnicos no assunto para empregar tais variações como apropriadas, e os inventores pretendem que a invenção seja posta em prática de outra maneira que especificamente descrita aqui. Conseqüentemente, a invenção inclui todas as modificações e equivalentes da matéria descrita nas reivindicações em anexo, como permitido pela lei aplicável. Ademais, qualquer combinação dos elementos supramencionados em todas as possíveis variações dos mesmos está contida na presente invenção, a menos que indicado aqui de outra maneira ou claramente contradito pelo contexto.

Além disso, inúmeras referências foram feitas a patentes e publicações impressas ao longo desse relatório descritivo. Cada uma das referências e publicações impressas, citadas acima, estão individualmente incorporadas aqui pela referência em sua totalidade.

Ademais, deve ser entendido que as modalidades da invenção descritas aqui são ilustrativos dos princípios da presente invenção. Outras modificações que possam ser empregadas fazem parte do escopo da invenção. Assim, como meio exemplificativo, porém não limitante, configurações alternativas da presente invenção podem ser utilizadas em conformi-

dade com os ensinamentos desta. Conseqüentemente, a presente invenção não está precisamente limitada ao que está apresentado e descrito.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para promover a ligação de um agente ativo a uma micropartícula cristalina pré-formada em suspensão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

5                    i) modificação do potencial químico do agente ativo, onde a referida modificação permite uma interação energeticamente favorável entre o agente ativo e a micropartícula, independente da remoção do solvente; e

                    ii) adsorção do agente ativo na superfície da  
10 micropartícula.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a modificação do potencial químico compreende modificar a estrutura, flexibilidade, rigidez, solubilidade ou estabilidade do agente ativo.

15                    3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a modificação do potencial químico do agente ativo compreende alterar as condições de solução.

                    4. Método, de acordo com a reivindicação 3,  
20 **CARACTERIZADO** pelo fato de que a alteração das condições de solução compreende adicionar um modificador de agente ativo à solução.

                    5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o modificador de agente ativo  
25 é selecionado do grupo consistindo em sais, tensoativos, íons, osmólitos, álcoois, caotrópicos, cosmotrópicos, ácido, base e solventes orgânicos.

                    6. Método, de acordo com a reivindicação 5,

**CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido sal é cloreto de sódio.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda a etapa de dissolução do agente ativo em uma fase fluida da suspensão de micropartículas e alteração do pH da fase fluida.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pH é alterado antes da adição do agente ativo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pH é alterado logo após a adição do agente ativo.

10. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o modificador de agente ativo melhora a estabilidade estrutural ou a farmacodinâmica do agente ativo.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente ativo é uma proteína, um peptídeo, um polipeptídeo, uma molécula pequena ou uma molécula de ácido nucléico.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente ativo é selecionado do grupo consistindo em insulina, grelina, hormônio do crescimento e hormônio da paratireóide (PTH).

13. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente ativo compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

14. Método, de acordo com a reivindicação 11,

**CARACTERIZADO** pelo fato de que a molécula pequena é uma molécula hidrófoba.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14,  
**CARACTERIZADO** pelo fato de que a molécula pequena é ciclos-  
5 porina A.

16. Método, de acordo com a reivindicação 11,  
**CARACTERIZADO** pelo fato de que a molécula pequena é uma molécula ionizável.

17. Método, de acordo com a reivindicação 2,  
10 **CARACTERIZADO** pelo fato de que a modificação do potencial químico do agente ativo compreende modular uma ou mais interações energeticamente favoráveis com a superfície da micropartícula.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17,  
15 **CARACTERIZADO** pelo fato de que a uma ou mais interações energeticamente favoráveis entre o agente ativo e a micropartícula compreende uma interação eletrostática.

19. Método, de acordo com a reivindicação 17,  
20 **CARACTERIZADO** pelo fato de que a uma ou mais interações energeticamente favoráveis entre o agente ativo e a micropartícula compreende uma interação hidrófoba.

20. Método, de acordo com a reivindicação 17,  
**CARACTERIZADO** pelo fato de que a uma ou mais interações energeticamente favoráveis entre o agente ativo e a micropartícula compreende uma interação de ligação de hidrogênio.  
25

21. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
**CARACTERIZADO** pelo fato de que a micropartícula compreende uma dicetopiperazina.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dicetopiperazina é fumaril dicetopiperazina.

23. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda uma etapa de remoção do solvente.

24. Processo para preparar uma composição de distribuição de fármaco, compreendendo um agente ativo e uma micropartícula cristalina, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

fornecimento de uma solução de agente ativo compreendendo uma molécula do agente ativo;

modificação do potencial químico do agente ativo;

15 fornecimento de uma micropartícula em uma suspensão ou em pó; e

combinação da referida solução de agente ativo com a referida suspensão ou pó de micropartícula.

25. Processo, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a modificação do potencial químico do agente ativo permite a interação entre o agente ativo e a micropartícula.

26. Processo, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a modificação do potencial químico do agente ativo compreende adicionar um modificador de agente ativo à solução.

27. Processo, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o modificador de agente ativo

é selecionado do grupo consistindo em sais, tensoativos, íons, osmólitos, álcoois, caotrópicos, cosmotrópicos, ácido, base e solventes orgânicos.

28. Processo, de acordo com a reivindicação 27,  
5 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o modificador de agente ativo diminui a solubilidade da molécula do agente ativo.

29. Processo, de acordo com a reivindicação 27,  
**CARACTERIZADO** pelo fato de que o modificador de agente ativo promove a associação entre o agente ativo e uma micropartí-  
10 cula.

30. Processo, de acordo com a reivindicação 27,  
**CARACTERIZADO** pelo fato de que o modificador de agente ativo melhora a estabilidade estrutural da molécula do agente ativo.

15 31. Processo, de acordo com a reivindicação 24,  
**CARACTERIZADO** pelo fato de que a micropartícula compreende uma dicetopiperazina.

32. Processo, de acordo com a reivindicação 31,  
**CARACTERIZADO** pelo fato de que a dicetopiperazina é fumaril  
20 dicetopiperazina.

FIG. 1A

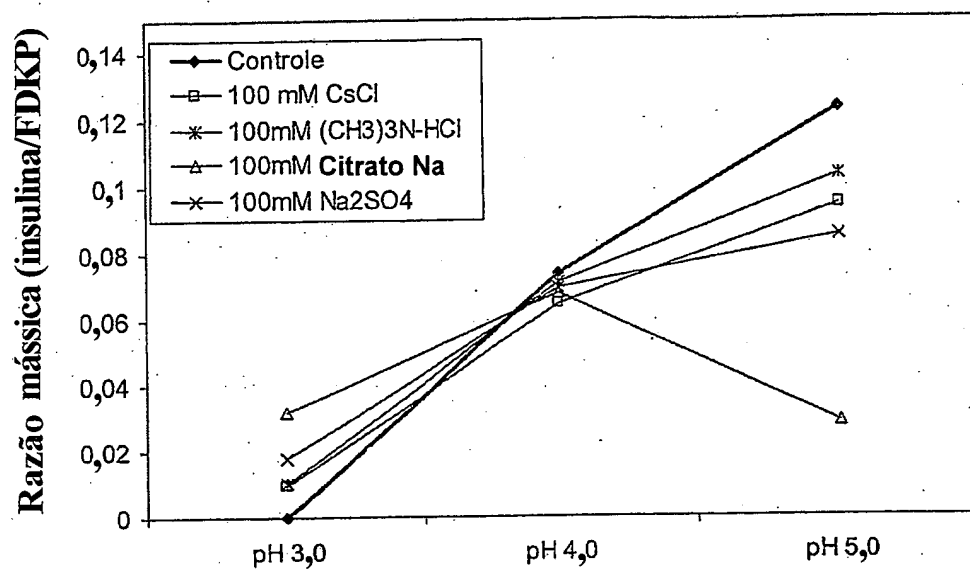


FIG. 1B

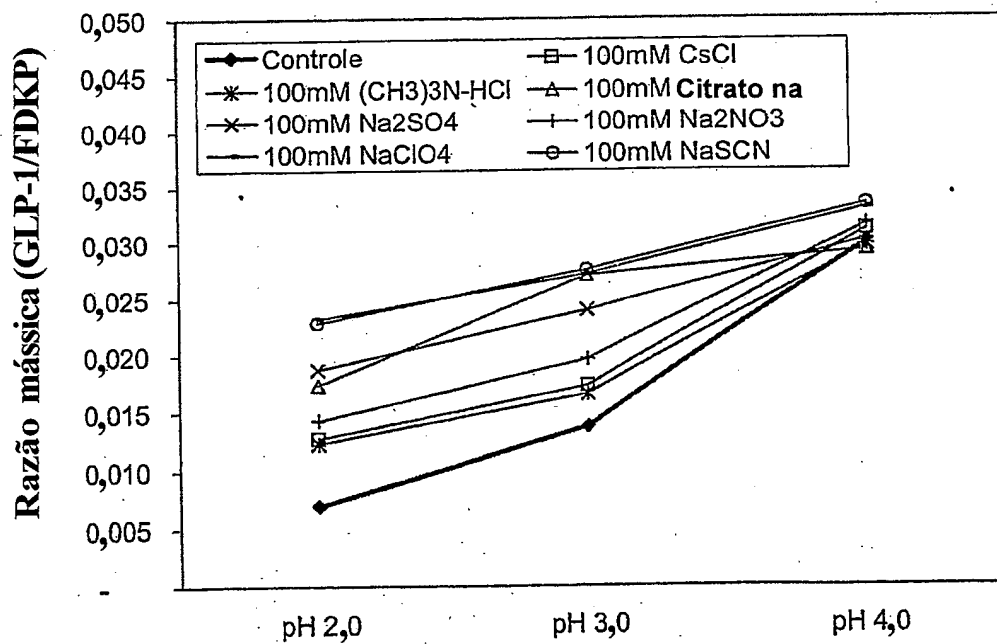


FIG. 1C

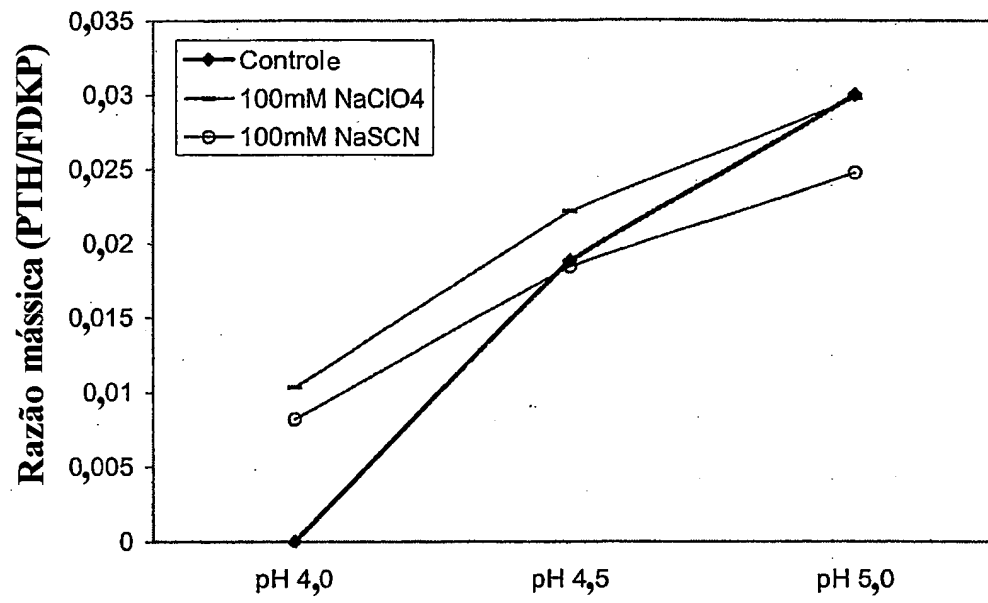


FIG. 2A

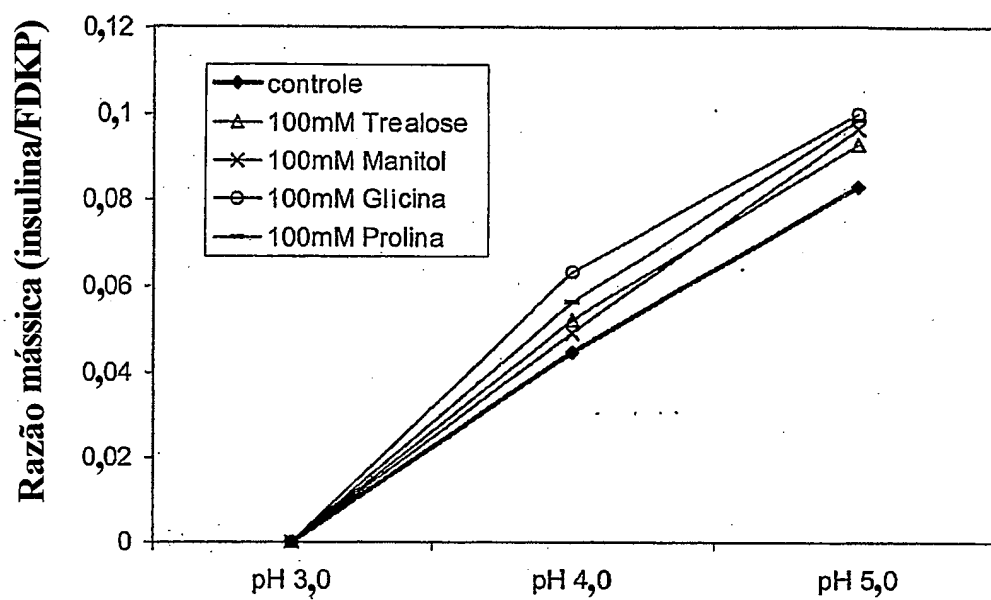


FIG. 2B

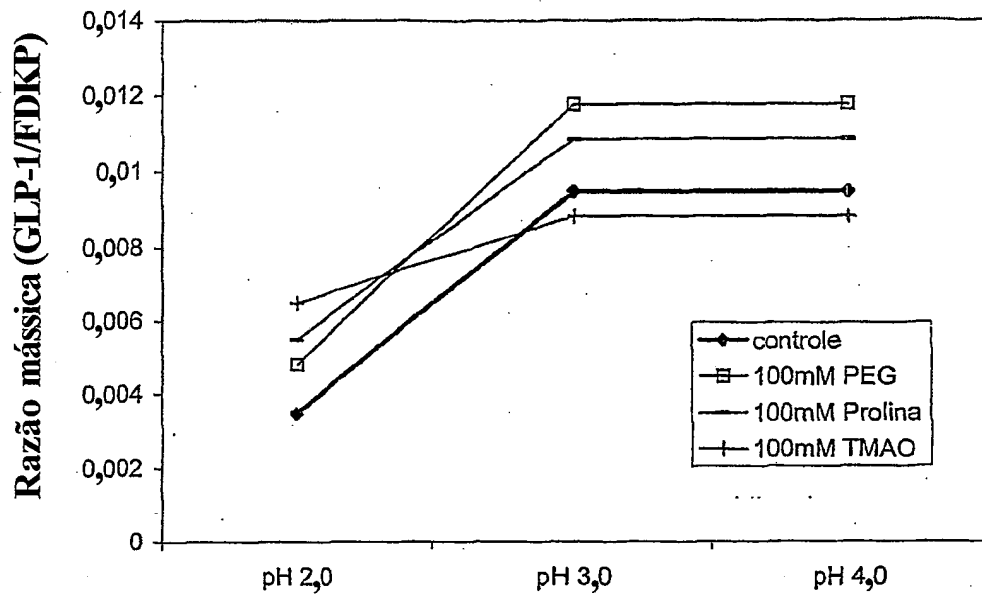
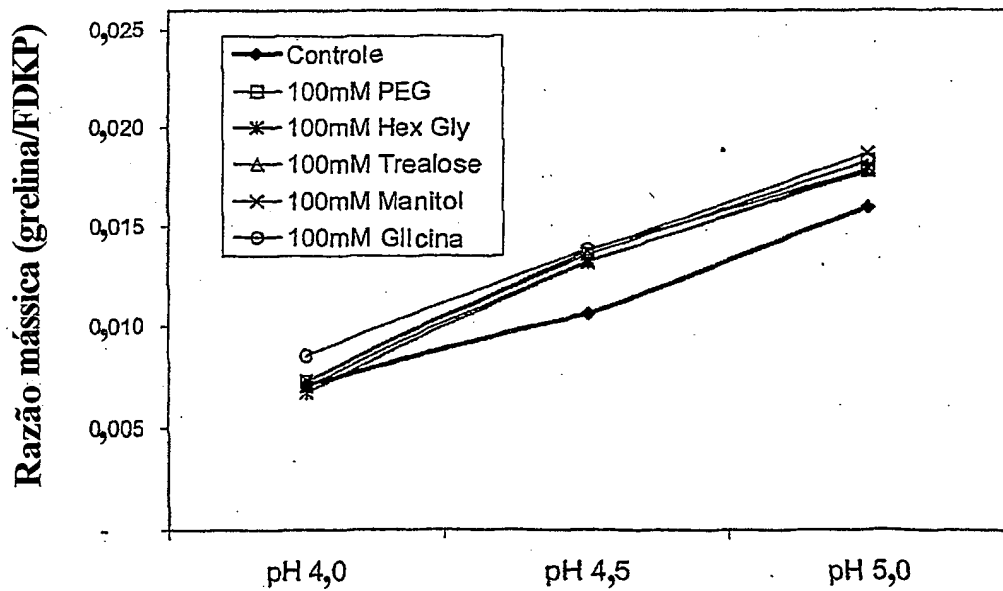


FIG. 2C



FIGS. 3A-3D

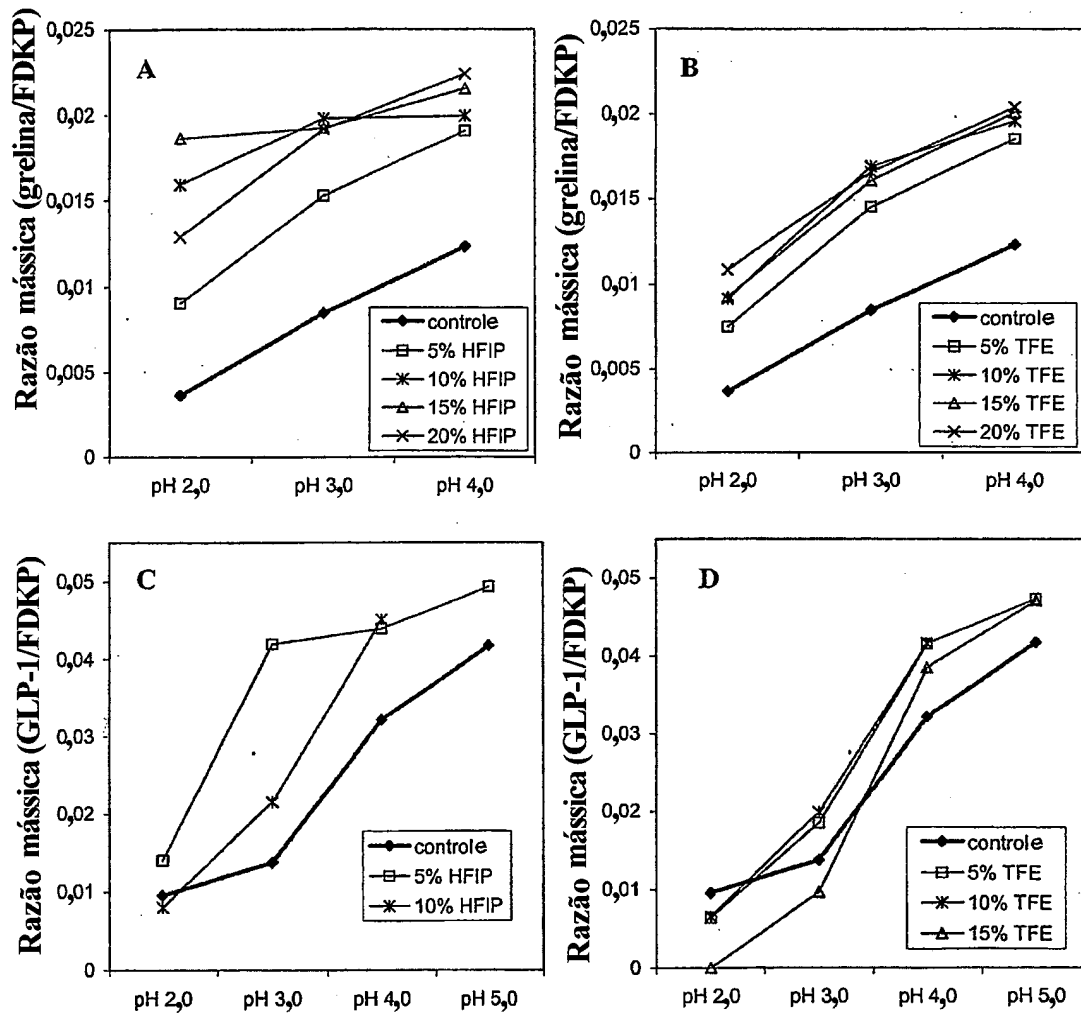


FIG. 4A

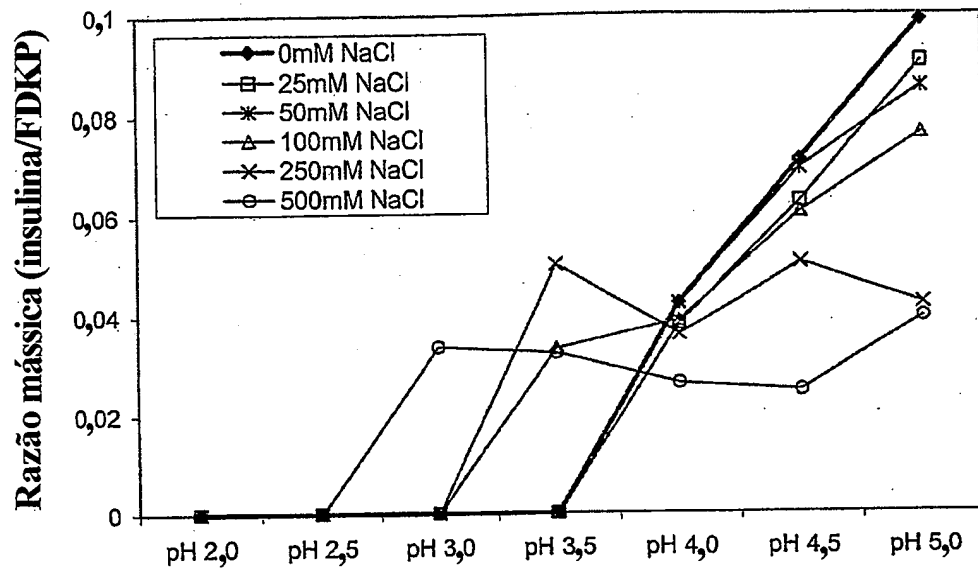


FIG. 4B

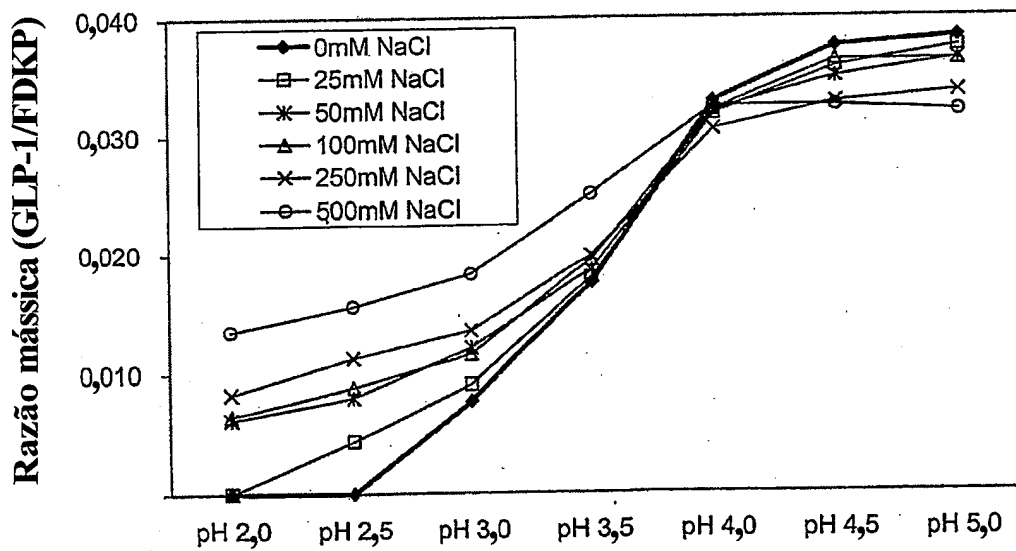


FIG. 4C

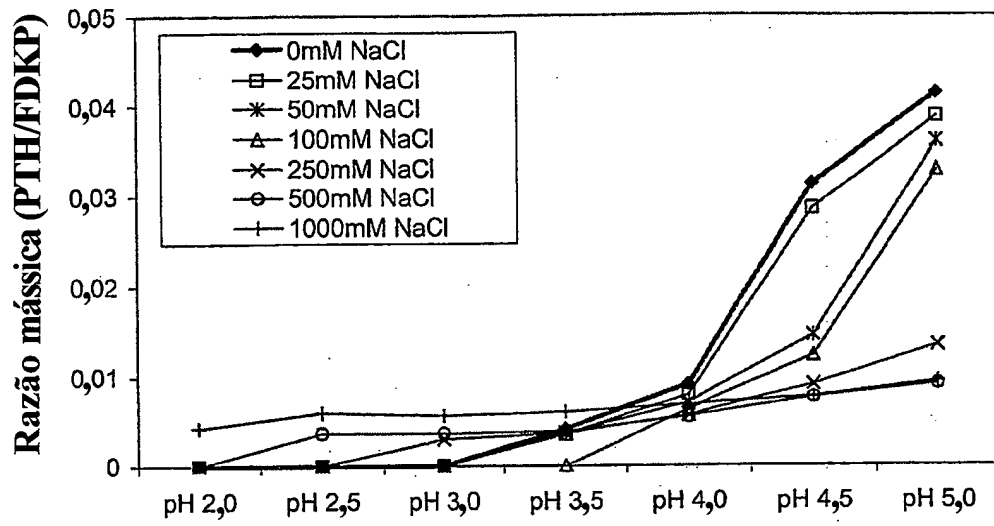


FIG. 4D

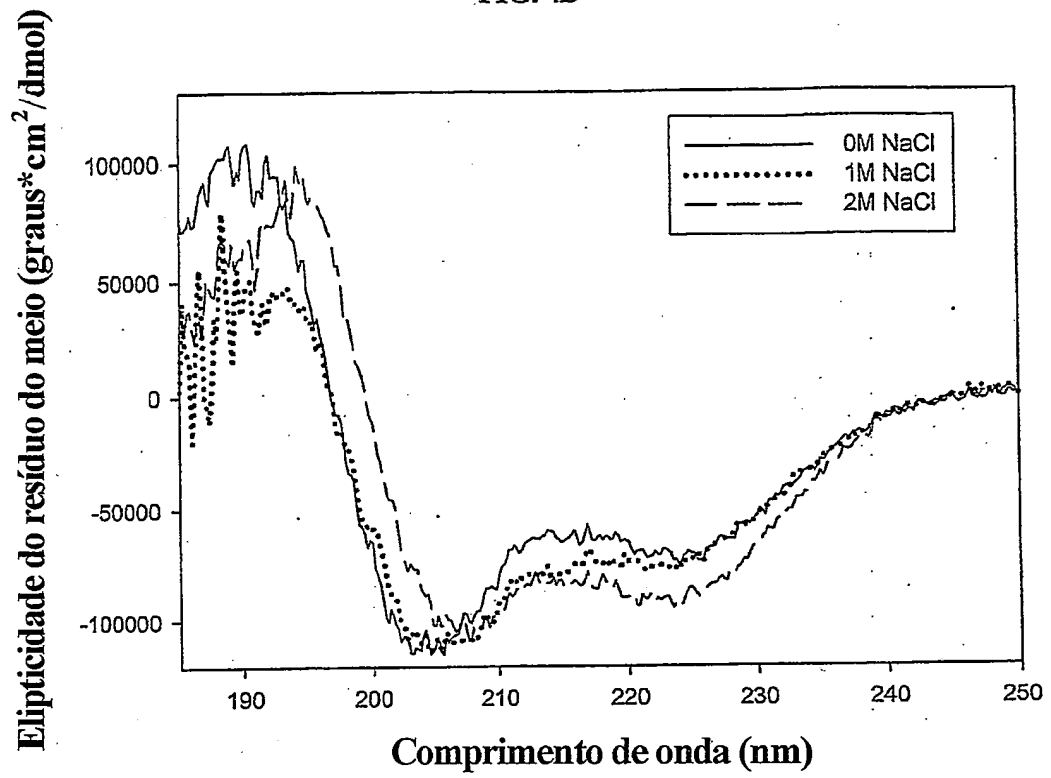


FIG. 5A

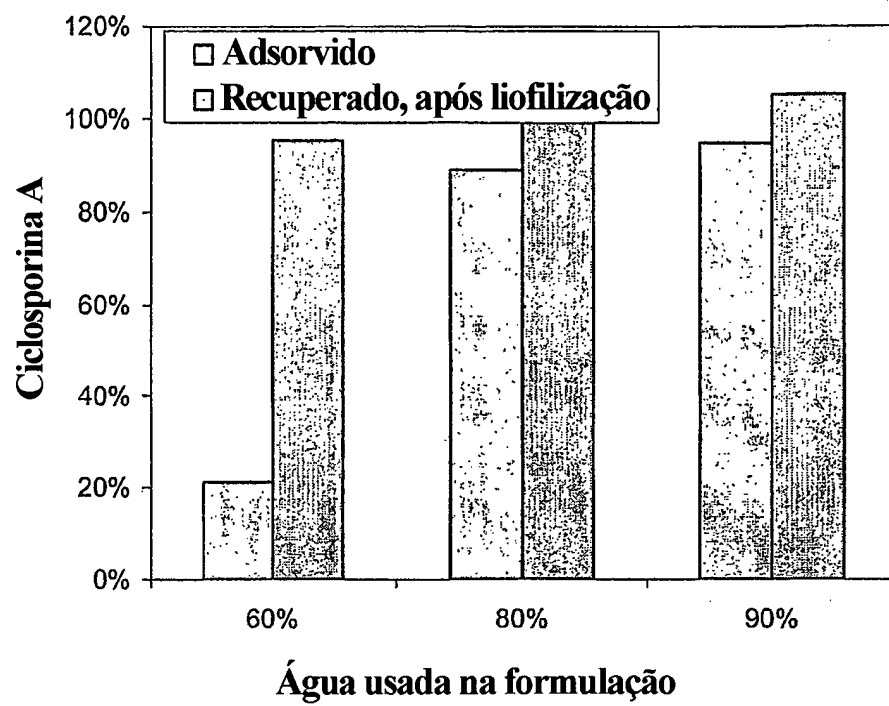


FIG. 5B

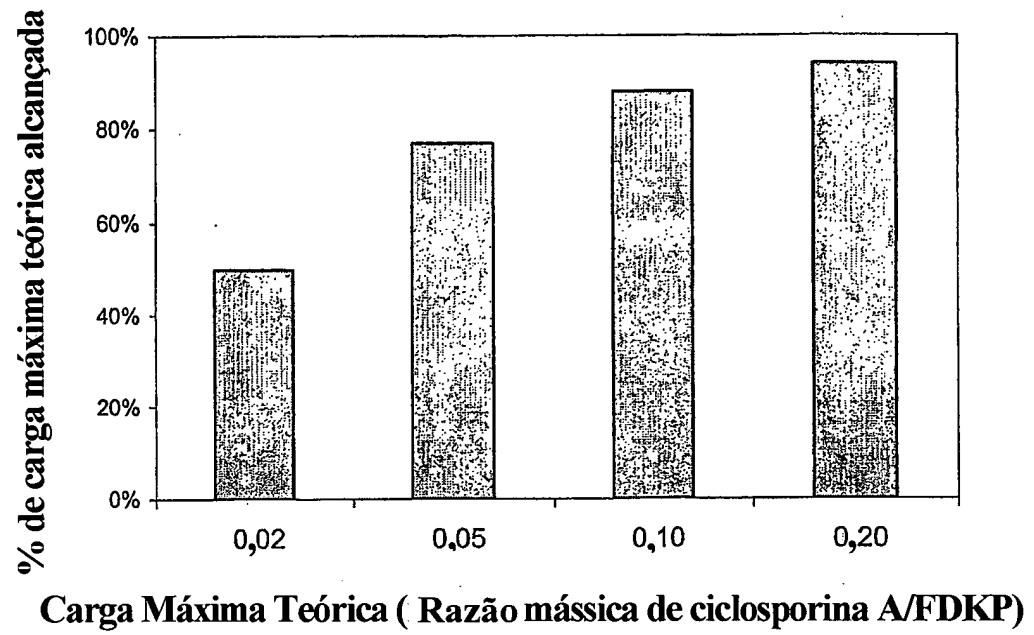
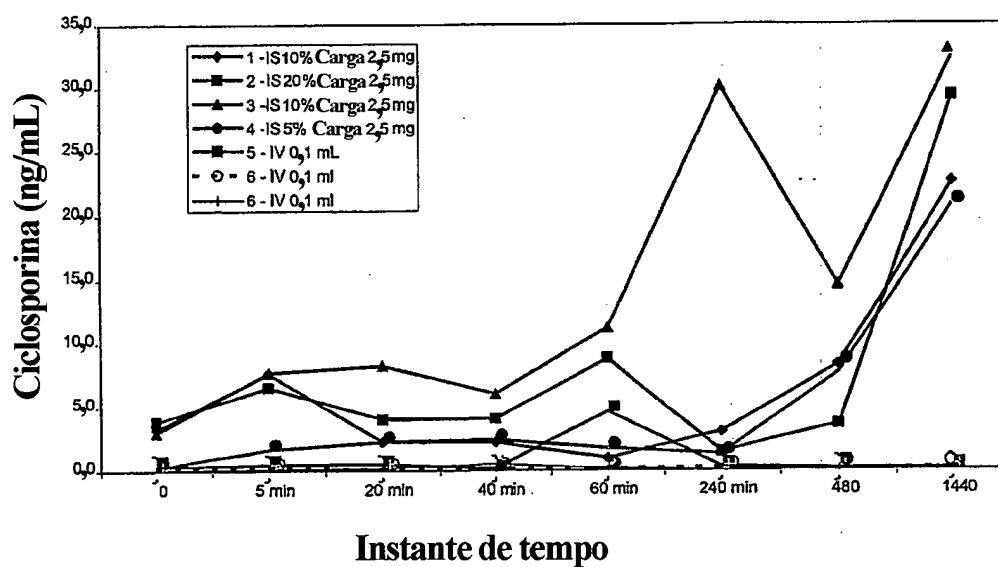


FIG. 6

**Estudo da Farmacocinética com Ciclosporina/FDKP administrada via uma única insuflação pulmonar ou injeção intravenosa em fêmeas de ratos Sprague Dawley**



R0015819-6

RESUMO

"MÉTODO DE FORMULAÇÃO DE FÁRMACO BASEADO NO AUMENTO DA AFINIDADE DE AGENTES ATIVOS PARA SUPERFÍCIES DE MICROPARTÍCULAS CRISTALINAS"

5. Métodos são fornecidos para promover a adsorção de um agente ativo em micropartículas pela modificação das propriedades estruturais do agente ativo, com o intuito de facilitar associação favorável à micropartícula.