



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

(21) **PI0616071-9 A2**

(22) Data de Depósito: 14/09/2006
(43) Data da Publicação: 07/06/2011
(RPI 2109)



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

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

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

(73) Titular(es): MANNKIND CORPORATION

(72) Inventor(es): KEITH A. OBERG

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006036034 de 14/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/033372 de 22/03/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE FORMULAÇÃO DE FÁRMACO COM BASE NO AUMENTO DA AFINIDADE DE SUPERFÍCIES DE MICROPARTÍCULAS CRISTALINAS PARA AGENTES ATIVOS. Métodos são fornecidos para revestir micropartículas cristalinas com um agente ativo através da alteração das propriedades de superfície das micropartículas a fim de facilitar a associação favorável na micropartícula pelo agente ativo. Tipo de propriedades de superfície que são alteradas pelos métodos descritos inclui propriedades eletrostáticas, propriedades hidrofóbicas e propriedades de ligação de hidrogênio.

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

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

5 O presente pedido reivindica o benefício sob 35 U.S.C. §119(e) ao Pedido Provisória dos Estados Unidos No. Serial 60/717.524 depositado no dia 14 de setembro de 2005, e Pedido Provisório dos Estados Unidos No. Serial 60/744.882, depositado no dia 14 de abril de 2006, os conte-
10 údos completos dos quais estão aqui incorporados através de referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção geralmente está na área de formulações de fármaco e é particularmente referida aos métodos de
15 revestimento de agentes ativos sobre a superfície de micropartículas cristalinas.

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

A liberação de agentes terapêuticos foi um problema principal. Administração oral é uma das rotinas mais comuns e preferidas de liberação devido a facilidade de administração, concordância do paciente, e custo diminuído. Porém, as desvantagens desta rota incluem potência baixa ou variável e adsorção ineficiente do terapêutico. Isto é particularmente evidente quando o composto a ser liberado é
25 instável sob condições encontradas no trato gastrointestinal. Uma variedade de revestimentos e métodos de encapsulação foi desenvolvida na arte, mas apenas alguns são eficazes na focalização deste assunto. Entretanto, há compostos te-

rapêuticos que tendem a ser menos ativos nas condições do trato gastrointestinal e devem ser administrados em dosagens mais altas a ser adsorvidas na circulação sanguínea em uma quantidade eficaz.

5 Uma ampla faixa de sistemas de formulação de fármaco foi desenvolvida para focalizar o problema de liberação de fármaco ideal e é baseada na incorporação de fármaco em uma matriz que age como um portador. Fatores considerados na formulação de fármaco incluem exigências que o sistema é não
10 tóxico, não reativo com o fármaco a ser liberado, econômico para fabricação, formado de componentes facilmente disponíveis, e consistente com respeito à composição final e características físicas, incluindo estabilidade e taxa de liberação. É, da mesma forma, preferível que o sistema de liberação
15 de fármaco seja formado facilmente de materiais facilmente removidos do corpo através de processos fisiológicos normais.

 Formulações de fármaco de micropartículas podem ser empregadas em numerosas rotinas de administração, mas
20 são particularmente bem adaptadas à liberação pulmonar. Vantagens dos pulmões para liberação de agentes que têm efeitos sistêmicos incluem a quantidade grande da área de superfície e facilidade de captação pela superfície mucosal. Patente dos Estados Unidos No. 6.071.497, aqui incorporada por referência,
25 descreve um sistema de liberação de fármaco pulmonar com base na formação de micropartículas de dicetopiperazina como também micropartículas com base em polímero.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Métodos são fornecidos para formar um revestimento de agente ativo sobre as micropartículas cristalinas. Em geral, micropartículas são revestidas com um agente ativo através da modificação das propriedades de superfície das micropartículas tal que o agente ativo tem uma afinidade mais alta para a superfície de micropartícula do que por permanecer na solução.

A presente invenção fornece métodos melhorados para revestir partículas cristalinas tais como micropartículas de dicetopiperazina de fumarila (FDKP) com agentes ativos, tais como proteínas, empregando-se associações direcionadas à ligação de hidrogênio, hidrofobicamente ou eletrostaticamente. Na presente invenção, o líquido pode opcionalmente ser removido (para recuperação de micropartículas revestidas por agente ativo) através de filtração ou secagem, ou substituído através da troca para um meio de solução diferente. Em todo caso, a remoção do meio líquido não é uma etapa obrigatória na formação do complexo de agente ativo-micropartícula. Esta invenção descreve um método para revestimento de micropartícula com base na mudança das propriedades de superfície das micropartículas cristalinas para alcançar a adsorção do agente ativo à micropartícula.

Em modalidades particulares da presente invenção, é fornecido um método de revestimento de uma micropartícula cristalina pré-formada na suspensão com um agente ativo que compreende; i) ajustar a interação energética entre o agente ativo e a micropartícula cristalina independente da remoção do solvente; e ii) permitir tempo pelo agente ativo adsor-

ver-se sobre a superfície da micropartícula. Em algumas modalidades, o método de revestir uma micropartícula cristalina pré-formada na suspensão com um agente ativo pode também compreender uma etapa de remover ou trocar o solvente sem efeito significativo sobre a interação entre o agente ativo e a micropartícula.

Em outras modalidades particulares da presente invenção, o método de revestir a micropartícula com agente ativo é realizado através da modificação das propriedades de superfície da micropartícula. Modificação das propriedades de superfície da micropartícula é obtida através da alteração das condições da solução. Estas condições, de uma maneira não limitante, compreendem mudar o pH. Em outras modalidades da invenção, as propriedades de superfície da micropartícula são modificadas através da: 1) alteração da polaridade da solução; 2) adição de íons monovalentes ou multivalentes; e 3) derivação química da micropartícula.

Em ainda outra modalidade, a presente invenção também compreende uma etapa de dissolver o agente ativo na fase fluida da suspensão de micropartículas e subseqüentemente mudar o pH. Tal etapa de dissolução do agente ativo em uma fase fluida refere-se à dissolução de um sólido. Além disso, tal etapa de dissolução do agente ativo refere-se à adição de uma solução mais concentrada do agente ativo além da adição de sólido.

Todavia, em ainda outra modalidade, as condições do pH da suspensão de micropartícula são alteradas para favorecer as interações entre o agente ativo e micropartícula

antes ou depois da adição do agente ativo.

Em outras modalidades, o agente ativo tem mais de um tipo de interação energeticamente favorável com a superfície de micropartícula.

5 Em outra modalidade particular da presente invenção, o agente ativo é insulina ou um análogo deste.

Em outras modalidades particulares da presente invenção, as propriedades de superfície que criam uma interação favorável entre o agente ativo e micropartícula são selecionadas a partir do grupo que consiste em propriedades
10 eletrostáticas, propriedades hidrofóbicas, e propriedades de ligação de hidrogênio.

Em outra modalidade da presente invenção, a micropartícula é porosa e tem superfícies interiores acessíveis
15 ao líquido volumoso da solução. Em uma modalidade, a micropartícula compreende uma dicetopiperazina tal como dicetopiperazina de fumarila mas não está limitada a tal.

Em modalidades da presente invenção, o método de revestimento produz uma monocamada de agente ativo sobre a
20 superfície de micropartícula. Em outras modalidades da invenção, a monocamada é contínua. Em outras modalidades da invenção, o agente ativo na monocamada pode ter uma orientação preferida.

Em ainda outra modalidade, um método é fornecido
25 para revestir uma micropartícula cristalina pré-formada na suspensão com insulina compreendendo ajustar a interação energética entre o agente ativo e a micropartícula cristalina independente da remoção do solvente; e absorver a insulina

sobre a superfície das micropartículas.

Solvente, quando empregado aqui, refere-se ao meio líquido em que o agente ativo e a micropartícula são "banhados". Não deve ser interpretado requerer que todos os
5 componentes estejam na solução. Na verdade, em muitos exemplos eles podem ser empregados para referir-se ao meio líquido no qual as micropartículas são suspensas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos seguintes formam parte da especificação presente e são incluídos para também demonstrar certos
10 aspectos dos exemplos descritos aqui. A invenção pode ser melhor entendida através da referência a um ou mais destes desenhos em combinação com a descrição detalhada das modalidades específicas apresentadas aqui.

15 Figura 1 descreve os perfis de titulação de HCl ultra-sônicos para componentes separados da suspensão de dicetopiperazina de fumarila (FDKP), partículas de FDKP e tampão, de acordo com os ensinamentos da presente invenção. A magnitude das mudanças no perfil de titulação de velocidade
20 ultra-sônica (Figura 1; Painel A) reflete mudanças de hidratação causadas por protonação de grupos carboxilato ionizáveis dos componentes da amostra. Os picos de atenuação ultra-sônicos em excesso (Figura 1; Painel B) resulta do relaxamento rápido na reação de troca de próton no ponto de saturação. Frequência (F) é 15 MHz, temperatura é 25°C.
25

Figura 2 descreve os perfis de titulação de ácido acético glacial ultra-sônicos para partículas de FDKP + insulina e partículas de FDKP sozinhas de acordo com os ensi-

namentos da presente invenção. O perfil de velocidade ultra-sônica foi calculado através da subtração da contribuição de insulina; frequência é 8 MHz, temperatura é 25°C. Atenuação ultra-sônica em excesso como uma função da concentração de ácido acético glacial adicionado é da mesma forma descrita. 5
Dois estágios de acidificação induzida por ácido acético glacial são similares àqueles observados através da titulação de HCl. O painel de inserção à esquerda (Painel A) descreve a associação do agente ativo com a micropartícula de FDKP em pH maior que aproximadamente 2,9. O painel de inserção à direita (Painel B) descreve a interação reduzida entre o agente ativo e a micropartícula em pH abaixo de cerca de 2,9. 10

Figura 3 descreve adsorção de proteína sobre micropartículas ionizáveis de acordo com os ensinamentos da presente invenção. Proteína foi adicionada à suspensão de micropartícula depois do ajuste de pH, proteína não ligada foi filtrada e as micropartículas dissolvidas para liberar a proteína não ligada. 15

Figura 4 descreve a dependência de pH para adsorção de agentes ativos sobre micropartículas de FDKP de acordo com os ensinamentos da presente invenção. Figura 4A descreve adsorção de insulina; Figura 4B descreve adsorção de anticorpo monoclonal anti-SSX-2₄₁₋₄₈, Figura 4C descreve adsorção de paratormônio (PTH) e Figura 4D descreve adsorção de grelina. 20
25

Figura 5 descreve a dependência de pH de adsorção de insulina sobre micropartículas de FDKP com concentração

de insulina limitante de acordo com os ensinamentos da presente invenção.

Figura 6 descreve a mudança na velocidade ultrassônica na suspensão de micropartícula de FDKP (11 mg/mL) na
5 titulação em etapas de micropartículas de FDKP com proteína (10 mg/ml) de acordo com os ensinamentos da presente invenção. A contribuição da proteína livre e o efeito da diluição de micropartícula de FDKP foram subtraídos. Temperatura é 25°C.

10 Figura 7 descreve as curvas de saturação para adsorção do agente ativo sobre micropartículas de FDKP de acordo com os ensinamentos da presente invenção. Curvas de carregamento são mostradas para agente ativo/ micropartículas de FDKP como uma função da concentração do agente ativo
15 em pH 5,0. Figura 7A descreve adsorção de peptídeo glucagon-símile 1 (GLP-1); Figura 7B descreve adsorção de PTH; Figura 7C descreve adsorção de anticorpo monoclonal anti-SSX2₄₁₋₄₉ e Figura 7D descreve adsorção de anticorpo monoclonal anti-MOPC-21.

20 Figura 8 descreve adsorção de agentes ativos sobre micropartículas em pH 5, vista que influenciado através de concentrações crescentes de sal de acordo com os ensinamentos da presente invenção. O agente ativo foi adicionado à suspensão de micropartícula depois do ajuste de pH, o agente
25 não ligado foi filtrado e as micropartículas dissolvidas para liberar o agente ligado. Figura 8A descreve adsorção de insulina, Figura 8B descreve adsorção de anticorpo monoclonal anti-SSX-2₄₁₋₄₉, Figura 8C descreve adsorção de PTH e Fi-

gura 8D descreve adsorção de grelina.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Agentes a ser liberados

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

Geralmente, qualquer forma do agente ativo pode ser revestida sobre a superfície de uma micropartícula cristalina. Estes materiais podem ser macromoléculas orgânicas incluindo ácidos nucléico, compostos orgânicos sintéticos, polipeptídeos, peptídeos, proteínas, polissacarídeos e outros açúcares e lipídios. Peptídeos, proteínas e polipeptídeos são todas as cadeias de aminoácidos unidas por ligações de peptídeo. Peptídeos são geralmente considerados ser menos que 30 resíduos de aminoácido, mas podem incluir mais. Proteínas são polímeros que podem conter mais de 30 resíduos de aminoácido. O termo polipeptídeo como é conhecido na arte quando empregado aqui, pode referir-se a um peptídeo, uma proteína, ou qualquer outra cadeia de aminoácidos de qualquer comprimento que contém ligações de peptídeo múltiplas, entretanto geralmente contendo pelo menos 10 aminoácidos. Os agentes ativos empregados na formulação de revestimento podem incluir-se sob uma variedade de classes de atividade biológica, tais como agentes vasoativos, agentes neuroativos, hormônios, anticoagulantes, agentes imunomodulantes, agentes citotóxicos, antibióticos, agentes antiviróticos, antígenos

e anticorpos. Mais particularmente, agentes ativos podem incluir, de uma maneira não limitante, insulina e análogos destes, hormônio de crescimento, paratormônio (PTH), grelina, fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago (GM-CSF), peptídeo glucagon-símile 1 (GLP-1), Vermelho Texas, alcinas, ciclosporinas, clopiogrel e PPACK (clorometil cetona de D-fenilalanil-L-prolil-L-arginina), anticorpos e fragmentos destes, incluindo, mas não limitados a, anticorpos humanizados ou quiméricos; F(ab), F(ab)₂, ou anticorpo de cadeia única sozinho ou fundido a outros polipeptídeos; anticorpos monoclonais terapêuticos ou diagnósticos para antígenos de câncer, citocinas, agentes infecciosos, mediadores inflamatórios, hormônios, e antígenos de superfície celular. Exemplos não limitantes de anticorpos a antígenos de tumor incluem anti-SSX-2₄₁₋₄₉ (sarcoma sinovial, ponto de ruptura 2 X), anti-NY-ESO-1 (antígeno associado ao tumor esofágico), anti-PRAME (antígeno preferencialmente expresso de melanoma), anti-PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), anti-Melan-A (antígeno associado ao tumor de melanoma), anti-tirosinase (antígeno associado ao tumor de melanoma), e anti-MOPC-21 (proteína de célula-plasma de mieloma).

Sistema de Liberação - Micropartículas Cristalinas

Essencialmente, o termo "micropartícula" refere-se a uma partícula com um diâmetro de cerca de 0,5-1000 µm, independente da estrutura interior ou exterior precisa. Dentro da categoria ampla de micropartículas, "microesferas" referem-se a micropartículas com forma esférica uniforme. Mi-

cropartículas cristalinas quando empregadas aqui referem-se a micropartículas que têm a estrutura interna entretanto não necessariamente a forma externa de um cristal e têm um arranjo regular de átomos em uma treliça espacial. Superfícies cristalinas ionizáveis referem-se a micropartículas cristalinas que tem a capacidade adicional de transportar uma carga elétrica.

Preferivelmente, a substância química que compõe a micropartícula cristalina é reversivelmente reativa com o agente ativo a ser liberado, como também não tóxica e não metabolizada, pelo menos por roedores e humanos. Além disso, a estrutura cristalina de micropartículas preferidas não é rompida substancialmente no processo de revestimento com o agente ativo. A composição da micropartícula cristalina determina que tipo de interações químicas pode ser manipulado para direcionar a adsorção de um agente ativo à superfície da micropartícula.

Várias substâncias podem ser empregadas para formar micropartículas cristalinas. Micropartículas como tais têm uma superfície externa, as propriedades das quais podem ser manipuladas no processo de revestimento. Materiais representativos dos quais micropartículas cristalinas podem ser formadas incluem mas não são limitados a: aminoácidos aromáticos, sais com solubilidade limitada em uma faixa de pH definida tal como dicetopiperazinas e sulfatos de morfina.

Patente dos Estados Unidos Nos. 5.352.461 e 5.503.852, aqui incorporada por referência em sua totalida-

de, descreve um sistema de liberação de fármaco com base na formação de micropartículas de dicetopiperazina (DKP) de derivados de dicetopiperazina tal como 3,6-bis[N-fumaril-N-(n-butil)amino] (da mesma forma referido como dicetopiperazina de fumarila ou FDKP; da mesma forma chamado (E)-3,6-bis[4-(N-carbóxi-2-propenil)amidobutil]-2,5-dicetopiperazina) que são estáveis em pH baixo e dissolvem no pH do sangue ou no intestino delgado. Como descrito nas patentes anteriores, o fármaco a ser liberado é combinado ou carregado com as partículas de dicetopiperazina através da formação de micropartículas de DKP na presença de fármaco (carga útil). Um sistema baseado em elementos estruturais de dicetopiperazina, ou um de seus derivados de substituição, incluindo, mas não limitado a, dicetomorfolinas e dicetodioxanos, forma micropartículas com distribuições de tamanho desejáveis e faixas de pH bem como boa tolerância da carga útil. Uma ampla faixa de características reproduzíveis, estáveis pode ser gerada com manipulações apropriadas dos grupos de substituinte.

Outras dicetopiperazinas que podem ser consideradas na presente invenção podem incluir 3,6-di(4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina; 3,6-di(sucinil-4-aminobutil)-2,5-dicetopiperazina (dicetopiperazina de succinila 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 destes. Sais de dicetopiperazina podem da mesma forma ser

utilizados na presente invenção e podem incluir, por exemplo, um sal farmacologicamente aceitável tal como o Na, K, Li, Mg, Ca, amônio, ou mono-, di- ou trialkilamônio (como derivado de trietilamina, butilamina, dietanolamina, trietanolamina ou piridinas, e similares). O sal pode ser um mono,
5 di, ou sal misturado.

Sais de ordem mais altos são considerados para dicetopiperazinas em que os grupos R contêm mais de um grupo ácido. Em outros aspectos da invenção, uma forma básica do
10 agente pode ser misturada com a dicetopiperazina para formar um sal de fármaco da dicetopiperazina, tal que a fármaco é o contra cátion da dicetopiperazina.

Patente dos Estados Unidos No. 6.444.226, e 6.652.885, cada qual aqui incorporada através de referência
15 em sua totalidade, descreve a preparação e fornecimento de micropartículas de DKP em suspensão aquosa à qual uma solução de agente ativo é adicionada, e em seguida a etapa crítica de liofilização da suspensão para produzir micropartículas que tem um revestimento do agente ativo. A base para
20 esta formulação é que o revestimento da micropartícula com agente ativo é direcionado através da remoção do meio líquido através de liofilização. (Veja, da mesma forma, Patente dos Estados Unidos No. 6.440.463 que está aqui incorporada através de referência em sua totalidade). Ao contrário dos
25 ensinamentos na arte anterior, a presente invenção fornece meios para ajustar a associação do agente ativo com a micropartícula antes da remoção do solvente. Desse modo, a remoção do meio líquido através de métodos físicos volumosos

(por exemplo, filtração ou sedimentação) ou métodos evaporativos (por exemplo, liofilização ou secagem por pulverização) pode resultar em cargas comparáveis.

5 Revestimento Controlado de Micropartículas Cristalinas

Revestimento controlado refere-se ao processo direcionado de adsorver o agente ativo sobre a superfície de uma micropartícula cristalina. O processo de revestimento envolve mudar as propriedades de superfície das micropartículas cristalinas em uma suspensão líquida através da mudança das condições da solução (tal como pH, temperatura, polaridade, resistência iônica e co-solventes), através da complexação para íons mono ou multi-valentes, ou através da derivação química. Alteração das propriedades de superfície da micropartícula antes ou depois da adição do agente ativo afeta suas interações químicas com agente ativo, desse modo resultando na adsorção do agente ativo à micropartícula cristalina. Interação química entre a micropartícula e o agente ativo direciona a adsorção e resulta em uma monocamada do agente ativo na superfície da micropartícula. Logo que uma molécula de agente ativo é adsorvida, esta porção da superfície de micropartícula não é exposta para outra interação e adsorção do agente ativo adicional nesse ponto de superfície particular. A monocamada resultante pode ser contínua (nenhuma abertura entre moléculas de agente ativo adsorvido sobre a superfície acessível) ou não contínua (aberturas de superfície de micropartícula exposta entre moléculas de agente ativo adsorvido).

Adsorção de Agente Ativo sobre Micropartículas

Como discutido acima, adsorção do agente ativo sobre as micropartícula resulta na formação de monocamadas (revestimento) do agente ativo sobre a micropartícula. Porém, há mais de um mecanismo em jogo na adsorção de um agente ativo, tal como insulina por exemplo, em micropartículas cristalinas:

A monocamada de um agente ativo, tal como insulina, que reveste a micropartícula é um estágio do processo de carregamento de insulina sobre a micropartícula mas não é necessariamente o resultado final no processo de carregamento quando ambas camadas monoméricas e multiméricas podem ser formadas com base nos energéticos do sistema.

Sob condições de solubilidade permissiva, tal como baixa concentração de insulina e/ou baixo pH (substancialmente abaixo de pH 5,0), forças atrativas entre insulina e a partícula de superfície de FDKP são muito maiores que as forças auto-associativas para insulina. Desse modo, o revestimento de insulina sobre a micropartícula ocorre de uma maneira em monocamada e a saturação é observada sem agregação ou formação de multicamada sobre a superfície de micropartícula (veja, Exemplo 6). Quando a saturação aproxima a solubilidade, devido à alta concentração de insulina e/ou pH próximo de 5,0 (um mínimo de solubilidade para insulina tipo silvestre), auto-associação de insulina fica mais energeticamente favorável. Desse modo, o revestimento pode proceder além do ponto de uma monocamada saturado e outras camadas de insulina podem ser adicionadas à partícula. Duas formas de

auto-associação podem ser reconhecidas: multimerização e agregação. Multimerização é caracterizada através de interações intermoleculares específicas e estequiometria fixada. Agregação é caracterizada através de interações intermoleculares não específicas e estequiometria indefinida. Geralmente falando, os agentes ativos multiméricos podem ser adsorvidos no estado multimérico, ou desassociados em monômeros, ou multímeros de ordem mais baixa, e adsorvidos à superfície nesse estado. Em qualquer caso, a agregação pode mediar a formação de camadas do agente ativo sobre a micropartícula. De acordo com os inventores, a compreensão atual, sob as condições gerais empregadas nos exemplos da presente descrição (tal como dissolução de insulina em ácido acético) deposição de camadas adicionais de insulina procede como agregação de insulina não hexamérica.

Método para Revestir Micropartículas

O procedimento para revestir micropartículas cristalinas, tais como micropartículas cristalinas pré-formadas, com agentes ativos é geralmente descrito como segue: micropartículas cristalinas previamente formadas através de precipitação, ou outro método, são suspensas em meio líquido, tal como água; e o meio é ajustado para alterar a superfície das partículas antes ou depois de adição do agente ativo. Neste momento, o agente ativo adsorverá à superfície de micropartícula e depois de um intervalo de tempo (por exemplo < 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 minutos; preferivelmente a partir de < 1 a pelo menos 5 minutos) o processo de carregamento estará completo. O meio líquido pode ser remo-

vido através de quaisquer meios incluindo filtração, centrifugação, liofilização ou secagem por pulverização ou substituído através de troca de meios. A adsorção pode ser confirmada através de qualquer um de dois métodos experimentais: 1) demonstrar a ausência de quantidades significantes de agente ativo em um filtrado ou sobrenadante e/ou 2) demonstrar a presença do agente ativo na fase sólida enquanto mostrando para que o agente ativo não precipita quando passado pelo mesmo procedimento na ausência das micropartículas.

Manipulação das Propriedades de Superfície de Micropartícula

Como descrito em outro lugar aqui, as propriedades de superfície da micropartícula podem ser manipuladas através de vários meios. As propriedades de superfície de micropartícula que podem ser manipuladas incluem, mas não são limitadas às, propriedades de ligação de hidrogênio, hidrofóbicas e eletrostáticas. Em várias modalidades, estas manipulações são realizadas na ausência ou presença do agente ativo, ou antes ou depois as micropartículas e o agente ativo são misturados juntamente. Quando a manipulação ocorre na presença do agente ativo, por exemplo, através da alteração da condição da solução, pode da mesma forma haver efeitos sobre o agente ativo que modificará sua afinidade para a superfície. Desse modo, em algumas modalidades da presente invenção, o revestimento da micropartícula pode envolver a manipulação de propriedades de superfície e modificação de propriedades do agente ativo. Métodos direcionados ao último

são descritos no Pedido de Patente US co-pendente No. ___/_____ (Parecer do Procurador No. 51300-00035) intitulado METHOD OF DRUG FORMULATION BASED ON INCREASING THE AFFINITY OF ACTIVE AGENTS FOR CRYSTALLINE MICROPARTICLE SURFACES depositado na data mesmo com o pedido presente e que é incorporado aqui através de referência em sua totalidade.

Interações eletrostáticas são atrações entre cargas opostas ou repulsões entre cargas similares que ficam mais fortes quando as cargas ficam mais próximas uma da outra. Interações eletrostáticas constituem um componente fundamental no entendimento das interações entre corpos carregados em soluções iônicas. Por exemplo, a estabilidade de partículas coloidais dispersas em um solvente pode ser explicada considerando-se a competição entre interações eletrostáticas repulsivas e as interações de van der Waals atrativas. Da mesma forma, a funcionalidade química (por exemplo, mas não limitada a COOH, NH, etc.) da superfície de micropartícula pode ser utilizada como o contra-íon a um agente ativo ionizado tal que o composto de partícula/agente compreende um sal. Interações eletrostáticas são da mesma forma de importância ao considerar a interação e adesão entre as partículas.

Alteração do pH do sistema de solução circundante pode mudar as propriedades eletrostáticas de micropartículas cristalinas ionizáveis na suspensão. Como demonstrado no Exemplo 3, mudar o pH da solução muda a ionização de uma micropartícula tal que o agente ativo adsorve à superfície de micropartícula. Especificamente, o Exemplo 4 mostra que mi-

cropartículas compostas de FDKP (3,6-bis[N-fumaril-N-(n-butil)amino]2,5-dicetopiperazina) são ionizáveis. As micropartículas são insolúveis em água abaixo do pH 3,5 mas a solubilidade aumenta rapidamente entre pH 3,5 e 5,0, presumivelmente devido à ionização dos grupos carboxila. A micropartícula de FDKP é ionizada parcialmente em pH 5 antes da dissolução completa em pH mais alto, que pode ser observado indiretamente através de espectroscopia ultra-sônica. Exemplo 5 demonstra o revestimento controlado da proteína sobre a superfície de micropartícula de FDKP. Em uma modalidade, micropartículas de dicetopiperazina são suspensas em uma solução ácida, o agente ativo é adicionado à suspensão, e o pH da solução é elevado depois que o agente ativo e as micropartículas são misturados juntamente. O pH aumentado altera as propriedades de superfície das micropartículas para criar um ambiente no qual o agente ativo tem uma afinidade mais alta para a micropartícula do que para o solvente.

Alternativamente, o pH da suspensão de micropartícula pode ser elevado imediatamente antes da adição do agente ativo à solução. As propriedades de carga de superfície da micropartícula são alteradas pela mudança no pH tal que o agente ativo tem uma afinidade mais alta para a micropartícula do que durante a permanência na solução e é adsorvido à superfície de micropartícula na adição.

Exemplos 6 e 7 demonstram o carregamento de insulina sobre partículas de FDKP através da manipulação de condições de pH. Finalmente, a saturação da micropartícula através da adsorção de proteína e a formação de uma monocama-

da são descritas no Exemplo 6.

Outros Métodos de Manipular as Superfícies das Micropartículas

Além das propriedades eletrostáticas, outras propriedades de uma superfície de micropartícula podem ser exploradas para controlar a adsorção do agente ativo. Micropartículas que contém compostos com imidazol, piridina, bases de Schiff funda, cetona, bioisósteres de ácido carboxílico, amidas, ou outros grupos funcionais que podem existir em estruturas múltiplas podem ser manipulados para modificar propriedades de superfície.

Interações hidrofóbicas são associações de grupos não polares entre si em soluções aquosas por causa de sua insolubilidade em água. Interações hidrofóbicas podem afetar vários processos moleculares incluindo, mas não limitados a, estabilização de estrutura (se de moléculas únicas, complexos de dois ou três moléculas, ou reuniões maiores) e dinâmicos, e faz contribuições importantes para processos de ligação de proteína-ligando e proteína-proteína. Estas interações são da mesma forma conhecidas por desempenharem um papel em eventos iniciais de duplicação de proteína, e estão envolvidas na reunião de complexo e fenômenos de auto-reunião (por exemplo, formação de membranas).

Interações hidrofóbicas podem ser manipuladas através da mudança da protonação de micropartículas cristalinas compostas de histidina. Protonação da histidina reduzirá a nucleofilicidade das micropartículas cristalinas e transmitirão uma carga positiva.

Interações de ligação de hidrogênio são forças de dipólo-dipólo especialmente fortes entre as moléculas; um átomo de hidrogênio em uma ligação polar (por exemplo, H-F, H-O ou H-N) pode experimentar uma força atrativa com um íon ou molécula eletronegativa adjacente, que tem um par não compartilhado de elétrons (usualmente um átomo de F, O ou N em outra molécula). Ligações de hidrogênio são responsáveis pelas propriedades únicas de água e são muito importantes na organização de moléculas biológicas, especialmente influenciando-se a estrutura de proteínas e DNA.

Na presente invenção, as propriedades de ligação de hidrogênio da superfície de micropartícula podem ser controladas através da derivação química. Aceptores/doadores de ligação de hidrogênio podem ser adicionados quimicamente para alterar a superfície de micropartícula. Por exemplo, o hidrogênio em uma ligação de N-H pode sofrer ligação de hidrogênio ao oxigênio em uma ligação de C=O. Se o N-H é substituído por um N-CH₃, em seguida esta interação de ligação de hidrogênio particular é removida. Igualmente, a substituição do grupo C=O com um grupo C=C da mesma forma remove esta interação de ligação particular.

Micropartículas com superfícies que contêm grupos aromáticos ionizáveis são polares quando ionizadas, porém, hidrofóbicos em seu estado não ionizado. Começar com superfícies protonadas e manipular condições de solução para reduzir ionização de superfície de partícula faz os agentes ativos hidrofóbicos ou aromáticos revestirem a superfície de micropartícula.

Micropartículas com grupos de superfície de cetona podem ser manipuladas através da mudança da polaridade da solução. Por redução da polaridade do solvente (adicionando solventes orgânicos de baixa polaridade a uma solução aquosa) a forma de enol é feita das espécies predominantes na superfície de partícula. Esta forma de enol é um doador de ligação de hidrogênio considerando que a forma de ceto é um acceptor de ligação de hidrogênio. A adsorção de fármacos contendo nitrogênio sobre a superfície de micropartícula é promovida desta maneira.

Micropartículas com grupos de superfície que sofrem isomerização induzida por temperatura ou pH podem da mesma forma ser induzidas para adsorver moléculas de fármaco através da manipulação das condições de solução. No caso destas superfícies, a introdução de uma dobra em um grupo de superfície linear devido à isomerização aumenta a mobilidade (fluidez) dos grupos na superfície de micropartícula. Isto permite a superfície formar mais contatos com o agente ativo do que é possível com uma superfície ordenada. Se as interações adicionais com o agente ativo são cada qual favoráveis, em seguida a energia de interação líquida fica favorável e o fármaco adsorve à superfície de micropartícula.

Técnicas de Remoção de Meio Líquido

Remoção do solvente depois do revestimento controlado das superfícies cristalinas com agente ativo pode ser alcançada através de métodos incluindo, mas não limitados a, sedimentação, filtração, ou secagem. Técnicas de secagem incluem, mas não são limitadas a, liofilização e secagem por

pulverização. Estas técnicas são conhecidas por aqueles versados na arte. Em uma modalidade da presente invenção, o solvente é removido através de secagem por pulverização. Métodos de micropartículas de dicetopiperazina se secagem por pulverização são descritos em, por exemplo, Pedido de patente Provisório U.S. No. 60/776.605 depositado em 22 de fevereiro de 2006, incorporado através de referência aqui para todos que abrangem considerando micropartículas de dicetopiperazina se secagem por pulverização.

10 Análise de Modificações de Propriedade de Superfície

A presente invenção emprega a técnica de espectroscopia ultra-sônica para analisar as mudanças nas propriedades de superfície de micropartículas cristalinas em um suspensão líquida, que promove ou realça a adsorção de um agente ativo à micropartícula cristalina. Como descrito em outro lugar aqui, tais mudanças envolvem mudar as condições da solução (tal como pH, temperatura, polaridade, resistência iônica, e co-solventes), através da complexação em íons mono ou multivalentes, ou através da derivação química para alterar as propriedades de superfície da micropartícula antes ou depois da adição do agente ativo.

Epectroscopia ultra-sônica é uma ferramenta analítica conhecida pelo técnico versado. Em brevidade, espectroscopia ultra-sônica emprega ondas sonoras. Em particular, usa uma onda acústica de frequência alta que investiga forças intermoleculares em amostras/materiais. Compressão oscilante (e descompressão) na onda ultra-sônica causa os-

cilação de arranjos moleculares na amostra, que responde através da repulsão ou atração intermolecular.

Passar através das amostras, a onda ultra-sônica perde sua energia (uma diminuição na amplitude) e muda sua
5 velocidade. Esta diminuição na amplitude e mudança na velocidade são analisadas como características da amostra. Portanto, a propagação de ondas ultra-sônicas é determinada por atenuação e velocidade ultra-sônica.

Velocidade ultra-sônica é determinada pela elasticidade e pela densidade do meio. Sólidos têm as interações
10 mais fortes entre as moléculas seguidas por líquidos e gases e são, portanto, mais rígidos comparados com líquidos e gases. Atenuação ultra-sônica é uma medida da energia que as ondas ultra-sônicas perdem quando elas passam através de uma
15 amostra. Caracteriza a transparência ultra-sônica da amostra e pode ser visto como uma redução de amplitude de onda.

Medida de multi-freqüência de atenuação ultra-sônica em sistemas homogêneos permite a análise de reações químicas rápidas tal como, mas não limitada a, troca de próton,
20 transições estruturais (por exemplo, isomerização), auto-associação (por exemplo, dimerização), agregação, ligação de ligandos às macromoléculas etc.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são incluídos para demonstrar modalidades da presente invenção. Deve ser apreciado
25 por aqueles de experiência na técnica que as técnicas descritas nos exemplos que seguem representam técnicas descritas pelo inventor funcionar bem na prática da presente in-

venção, e desse modo pode ser considerado constituir modos preferidos para sua prática. Entretanto, aqueles de experiência na técnica devem, levando em consideração a presente descrição, apreciar que muitas mudanças podem ser feitas nas modalidades específicas que são descritas e ainda obter um resultado igual ou semelhante sem partir do espírito e escopo da invenção.

Exemplo 1

Procedimento Geral Para Carregar Micropartículas

10 Com Agentes Ativos

A Tabela 1 abaixo é um exemplo de revestimento eletrostaticamente dirigido de uma micropartícula cristalina ionizável (micropartículas de FDKP) utilizando adsorção controlada por pH. Nestas experiências, suspensões de micropartícula de FDKP foram preparadas em pH 2,0 e 4,5. Proteína (hormônio de crescimento) foi em seguida adicionada a cada para produzir condições finais de 5 mg/mL de partículas de FDKP e 200 µg/mL de proteína. Depois de misturar, o líquido em volume foi removido da suspensão através de filtração. O material capturado no filtro foi em seguida dissolvido e coletado. A concentração de proteína em todas as frações foi quantificada através de HPLC.

Em pH baixo (2,0), a proteína não adsorve as partículas e toda a proteína foi encontrada no primeiro filtrado. Aumentando-se o pH em 4,5, as propriedades de superfície das partículas foram mudadas por ter uma afinidade alta para a proteína. Sob estas condições, a proteína ligou-se às micropartículas e não foi vista no filtrado. Para deter-

minar a quantidade de proteína associada com as micropartículas, a proteína foi recuperada quando as micropartículas foram dissolvidas. Os controles livres de partícula demonstram que a proteína, por si própria, não foi mantida no filtro sob as condições empregadas, isto é, a proteína não se auto-associa ou de outra maneira agrega-se em partículas maiores que os poros do filtro.

Tabela 1. Concentrações de proteína em uma experiência de adsorção com micropartículas de FDKP.

Fração	PH 2,0 com partículas	PH 2,0 sem partículas	PH 4,5 com partículas	PH 4,5 sem partículas
Conc. Inicial ($\mu\text{g/mL}$)	200	200	200	200
Filtrado (proteína não ligada)	146	181	0	145
Partículas dissolvidas	0	0	180	0

10 Valores mostrados são resultados de quantificação de HPLC das soluções depois da fração

Exemplo 2

Controle da Ionização de Micropartícula de FDKP

Através da Manipulação do pH

15 FDKP é uma molécula em forma de bastão com um grupo funcional de ácido carboxílico em cada extremidade que é essencialmente insolúvel em água abaixo do pH 3,5 quando os ácidos carboxílicos são protonados e não carregam nenhuma carga. A solubilidade de FDKP aumenta rapidamente acima do

pH 3,5 correspondendo à ionização dos grupos carboxila. Modelagem de cristais de FDKP, que formam-se como placas com duas faces grandes, planas e extremidades estreitas, indica que as moléculas de FDKP semelhantes a bastão alinham-se perpendicularmente às extremidades das placas de forma que extremidades de ácido carboxílico da molécula são dispostas nas faces grandes das placas. Em uma base teórica, as superfícies de cristais de FDKP devem ser parcialmente ionizadas em torno do pH 5,0, onde a solubilidade é cerca de 1 mg/mL, exatamente abaixo do pH ao qual uma suspensão de 10 mg/mL de micropartículas dissolverá.

A ionização de superfícies cristalinas de FDKP foi observada indiretamente com espectroscopia ultra-sônica. Na Figura 1, a curva de titulação ultra-sônica de micropartículas de FDKP e tampão é mostrada. Nesta experiência, uma solução contendo 200 mM de HCl foi adicionada em alíquotas pequenas em uma suspensão agitada de 10 mg/mL de micropartículas de FDKP em 20 mM de tampão de acetato de amônio. O pH inicial foi 4,8. Depois de cada adição de HCl, o sistema foi permitido equilibrar-se e dados ultra-sônicos foram coletados.

A diminuição na velocidade ultra-sônica observada com concentração ácida crescente (pH decrescente) reflete a protonação de grupos ácidos carboxílicos no sistema. Quando os grupos foram protonados e tornaram-se não carregados, a estrutura de água ao redor deles relaxou e ondas ultra-sônicas foram transmitidas mais lentamente (a velocidade ultra-sônica diminuiu). Por causa das micropartículas de FDKP,

superfícies de carboxilato e o grupo carboxilato no tampão de acetato são quimicamente muito similares, as curvas foram da mesma forma similares. As diferenças, entretanto, foram causadas pelas micropartículas de FDKP. Primeiro, a magnitude da mudança de velocidade com micropartículas de FDKP foi maior. Esta diferença resulta na protonação de grupos carboxilato ionizados na superfície de micropartícula de FDKP. O pico na curva de atenuação, que ocorre perto do ponto de protonação completo, foi trocado para concentração ácida ligeiramente mais alta na suspensão de FDKP. Finalmente, ambos os parâmetros de FDKP continuaram a mudar quando o pH foi reduzido de 3,5 para 2,3. Estas mudanças refletem modificações adicionais nas propriedades de superfície das partículas que podem incluir ordenação dos grupos carboxila de superfície ou outras modificações micro-estruturais.

Exemplo 3

Carregamento de Proteína sobre Micropartículas de FDKP através da Manipulação de pH das Propriedades de Superfície

A adsorção de proteínas sobre superfícies de micropartícula ionizáveis através de manipulação de pH pode ser obtida de duas maneiras. A proteína pode ser adicionada e em seguida o pH ajustado para causar a ionização da superfície com adsorção concomitante de proteína. Este processo é reversível. Alternativamente o pH da suspensão de partícula pode ser ajustado para causar ionização da superfície antes da proteína ser adicionada.

Os dados de titulação ultra-sônica mostrada na Fi-

gura 2 indicam a associação de proteína (insulina) com as micropartículas de FDKP em pH maior do que cerca de 2,9 e interação reduzida em pH abaixo de cerca de 2,9.

Uma suspensão de micropartículas de FDKP foi preparada em 20 mM de tampão de acetato de amônio, pH 4,8, e combinada com uma solução de matéria-prima de insulina para produzir 800 μ l de suspensão com uma concentração final de 10 mg/mL de micropartículas de FDKP e concentração de insulina de 1 mg/mL. Esta suspensão foi introduzida em um espectrômetro ultra-sônico. Enquanto agitando suavemente, ácido acético glacial foi gradualmente adicionado em alíquotas de 5 μ L para diminuir o pH. Em cada etapa na titulação, dados ultra-sônicos foram coletados.

A mudança na velocidade ultra-sônica foi relacionada (proporcional) à quantidade de área de superfície (água de hidratação) das partículas e/ou macromoléculas na amostra. A Figura 2 ilustra que pH acima de cerca de 2,9 (10% em v/v de ácido acético adicionado), as curvas de velocidade para micropartículas sozinhas (partículas de FDKP) e micropartículas com insulina (partículas de FDKP + Insulina) coincidiram-se. Isto indicou que a quantidade de área de superfície no sistema é essencialmente igual à área de superfície de micropartículas de FDKP sozinhas. A insulina teve uma contribuição insignificante porque é muito pequena comparada às micropartículas. pH abaixo de 2,9, as partículas de FDKP e partículas de FDKP + curvas de Insulina divergiram-se. A velocidade ultra-sônica das partículas de FDKP + curva de Insulina foi mais alta aqui, que indicou que houve

mais área de superfície exposta à água do que nas amostras de partículas de FDKP sozinhas. Esta área de superfície adicional foi de insulina livre na suspensão. Quando o pH aumentou de cerca de 2,7 para cerca de 2,9, a área de superfície de insulina foi perdida através da adsorção de insulina em superfícies de micropartícula de FDKP, e a intensidade mais alta das micropartículas de FDKP + curva de Insulina desapareceu quando a insulina livre desapareceu do sistema.

Como notado acima, o segundo método direcionado a pH de partículas de revestimento com proteína é suspender partículas em um meio líquido e ajustar condições de solução para ionizar a superfície de partícula. A proteína pode em seguida ser adicionada à suspensão e moléculas de proteína imediatamente absorverão. A Figura 3 ilustra a quantidade de proteína (insulina) que foi adsorvida em adição para suspensões ajustadas por pH de micropartículas de FDKP.

Suspensões de micropartícula de FDKP foram preparadas em 5 mg/mL e um excesso de proteína (2 mg/mL) foi adicionado. (Um excesso de proteína, como referido aqui, é aquela quantidade em que é acreditado ser necessária para formar um revestimento de monocamada a superfície acessível da micropartícula de FDKP). Depois da incubação, proteína não adsorvida foi removida através de filtração. Os sólidos mantidos no filtro (retentado) foram dissolvidos e as quantidades de micropartículas de FDKP e proteína mantidas no filtro foram quantificadas através de HPLC. A relação de massa proteína / partícula foi determinada a partir desta quantificação. Com base na área de superfície conhecida

destas partículas e as dimensões moleculares da proteína, uma monocamada contínua de proteína adsorvida foi calculada para ocorrer em uma relação de massa de cerca de 0,07. Na base daquela estimativa pode ser visto a partir deste exemplo que uma monocamada contínua foi formada em pH 5,0 e aquelas monocamadas não contínuas formadas em pH 3,5 a pH 4,5.

Adicionalmente, partes diferentes de micropartículas de FDKP revestidas com agente ativo seco foram suspensas em uma solução ácida (pH final cerca de 2,0) ou água (pH final cerca de 4,5). Os agentes ativos diferentes incluíram insulina, hormônio de crescimento e insulina aspart (um tipo de insulina de ação rápida), como mostrado na Tabela 2. O solvente foi filtrado a partir destas suspensões e as partículas mantidas foram dissolvidas e coletadas. A quantidade do agente ativo em todas estas amostras foi quantificada através de HPLC. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Para cada uma das partes, o agente ativo foi liberado das partículas na solução ácida. Portanto, através da protonação das superfícies dos microcristais, o agente ativo desorve as superfícies cristalinas. Quando as partículas foram re-suspensas em água, que não muda o estado de ionização da superfície de partícula, a proteína permaneceu adsorvida.

Tabela 2. Agentes ativos revestidos sobre micropartículas de FDKP

	Hormônio de Cres- cimento	Insulina	Insulina Aspart
--	------------------------------	----------	-----------------

Solução Padrão de Agente Ativo	250	1103	1099
Re-suspensos em Solução Ácida	240	980	893
Re-dissolvidos depois da filtração da solução ácida	0	49	29
Re-suspensos em água	0	4	0
Re-dissolvidos depois da filtração em água	191	936	982

Valores na tabela são áreas de pico interagidas a partir da quantificação de HPLC (mAU*seg em, 215 nm)

Exemplo 4

Caracterização de Adsorção Direcionada ao pH de

5 Insulina sobre Micropartículas de FDKP

Insulina foi adsorvida (carregada) sobre micropartículas de FDKP em um processo controlado por pH através da mistura de uma suspensão aquosa a partir de micropartículas de FDKP com uma solução aquosa de insulina. Para caracterizar o efeito de pH sobre a ligação de insulina em micropartículas de FDKP, uma suspensão de 5 mg/mL de partículas de FDKP em valores de pH variados foi preparada. Um excesso de insulina dissolvida foi, em seguida, adicionado, permitido adsorver cerca de 5 minutos, depois que a insulina não ligada foi removida através de filtração. As partículas sólidas

com insulina adsorvida foram recuperadas a partir do filtro (retentado), dissolvidas e coletadas. As quantidades de insulina e micropartículas de FDKP dissolvidas foram quantificadas através de HPLC. A quantidade de insulina adsorvida foi calculada como uma fração da massa total do retentado. A dependência de pH de adsorção de insulina é mostrada na Figura 4A; adsorção de insulina aumentou como uma função de pH. Resultados similares foram obtidos para anticorpo monoclonal SSX-2₄₁₋₄₉, PTH, e grelina como ilustrado nas Figuras 4B, C, e D respectivamente.

Adicionalmente, partículas de FDKP foram suspensas em soluções de insulina (10 mg/mL) de pHs diferentes. A relação em massa de partículas de FDKP para insulina foi de 10:1. A concentração de insulina não ligada no sobrenadante foi determinada através de HPLC depois que o sobrenadante foi separado a partir das partículas através de centrifugação. Ligação de insulina foi determinada como a diferença da concentração de insulina inicial. Os dados relatados na Figura 5 demonstram que pH crescente resultou na insulina reduzida na solução e teor de insulina aumentado nas partículas de FDKP.

Desse modo, ligação de insulina às partículas de FDKP aumenta com pH crescente de cerca de pH 3,0 até cerca de pH 5. Preferivelmente, a solução de insulina é adicionada em pH 3,6 e sob estas condições aproximadamente 75% da insulina é adsorvida a partir da solução sobre as partículas. Ligação de Insulina aumenta para > 95% quando o pH aumenta para $\geq 4,0$. Ligação substancialmente completa é obti-

da em cerca de $\text{pH} \geq 4,2$, preferivelmente cerca de 4,4. Em pH mais alto do que 5,0, as micropartículas de FDKP começam a dissolver e não mantêm mais a estrutura de uma micropartícula cristalina.

5 Exemplo 5

Descrição de Carregamento de Micropartículas de FDKP Com Insulina

 Em um formato de escala de produção (2 - 5 kg), micropartículas de FDKP são formadas através de precipitação de ácido com ácido acético e lavadas. Uma solução de insulina em pH 3,6 é adicionada à suspensão de partícula de FDKP. A solução de matéria-prima de insulina é 10% em peso de insulina e 2,5% em peso de ácido acético (pH de aproximadamente 3,6). Hidróxido de amônio é empregado para ajustar o pH da mistura em 4,5. A Tabela 3 indica as quantidades dos vários componentes por quilograma de formulação empregada para preparar partículas contendo ~11,4% em peso de insulina. Polissorbato 80 pode ser incorporado durante a formação de partícula e pode melhorar as características de manipulação das partículas finais. Tempo é permitido para adsorção de insulina sobre as partículas de FDKP e garantir misturando completa. A mistura é, em seguida, adicionada em gotas ao nitrogênio líquido para o congelamento *flash* da suspensão. O meio líquido é removido através da liofilização para produzir partícula de FDKP / produto de fármaco em volume de insulina. Alternativamente, a mistura é liofilizada. A Tabela 4 indica as quantidades dos vários componentes no produto em volume depois da remoção do meio líquido.

Tabela 3. Composição de partículas de FDKP / Fórmula em Batelada de Insulina

Componente	11,4% de FDKP / Insulina (Gramas por Kg de formulação)
Insulina, USP	114 g
FSKP	870 g
Polissorbato 80, USP*	34,8 g
Solução de Amônia Forte, NF	572 g
Ácido acético (glacial), NF	3680 g
Água Purificada, NF	179000 g
Nitrogênio, NF	Quando necessário

Tabela 4. Composição de partículas de FDKP / insulina

Componente	11,4% FDKP / Insulina, processo (Quantidade por formulação em grama)
Insulina, USP	3,0 IU (0,11 mg)
FDKP	0,87 mg
Polissorbato 80, USO*	0,007 mg
Solução de Amônia Forte, NF	Removido durante o processo
Ácido acético (glacial), NF	Removido durante o processo
Água Purificada, NF	0,012 mg
Nitrogênio, NF	Removido durante o processo

5 Nas Tabelas 3 e 4 acima, NF denota - Formulário Nacional

* Teor de Polissorbato 80 é estimado por um ensaio

de HPLC/MS.

** A formulação de FDKP / Insulina contém cerca de 1,2% de água residual depois da liofilização. Quantidades de traço de ácido acético e hidróxido de amônio podem da
5 mesma forma estar presentes.

Exemplo 6

Saturação de Superfícies de Micropartícula através de Proteína (Formação de uma Monocamada Contínua)

O revestimento de superfície de uma micropartícula
10 com uma monocamada deve ser um processo saturável. Isto é, sua área de superfície acessível e o diâmetro da molécula de agente ativo ditarão a capacidade da superfície de micropartícula. A Figura 6 ilustra esta saturação.

Uma suspensão de micropartículas de FDKP foi pre-
15 parada e o pH foi ajustado entre pH 3,0 e pH 3,5 ponto nos quais as superfícies ionizam-se parcialmente. Neste procedimento, pH mais alto não pode ser empregado porque teria causado auto-associação do agente ativo, insulina. Porções pequenas de uma solução de insulina concentrada foram adi-
20 cionadas à suspensão agitada. Depois de cada adição, a amostra foi permitida estabilizar-se e dados ultra-sônicos foram coletados.

A Figura 6 mostra que uma redução na velocidade ultra-sônica é observada quando a concentração de proteína
25 foi aumentada. Este tipo de mudança na velocidade ultra-sônica é típico para ligação de ligando em soluções aquosas e indica adsorção da proteína ativa às superfícies de micropartícula de FDKP. A diminuição de velocidade resulta da

liberação de água de hidratação da micropartícula de FDKP e superfícies de proteína. Quando a água de hidratação é deslocada através de adsorção do agente ativo, sua estrutura relaxa e produz uma diminuição líquida na velocidade ultrasônica através da amostra. Quando todos os sítios de ligação na superfície das micropartículas de FDKP foram saturados, isto é, uma monocamada de proteína formou-se, a curva se iguala. A formação de monocamada foi da mesma forma demonstrada pelos dados nas Figuras 7A-7D que mostrou que a adsorção de vários agentes ativos (GLP-1 [Figura 7A]; PTH [Figura 7B]; anticorpo monoclonal anti-SSX-241-49 [Figura 7C]; e anticorpo monoclonal anti-MOPC-21 [Figura 7D]), sobre micropartículas alcançou a saturação quando a concentração do agente ativo é aumentada em uma concentração constante de micropartículas de FDKP (5 mg/mL). Estes estudos foram conduzidos em pH 5,0 onde a adsorção ideal do agente ativo às micropartículas é observada. GLP-1 não se auto-associa às concentrações empregadas (como descrito no Pedido de Patente Provisório U.S. No. 60/744.882).

20 Exemplo 7

Evidência para Mecanismo de Interação Eletrostático

Evidência para um mecanismo eletrostático de interação é a capacidade de interferir-se com adsorção através do enfraquecimento das interações eletrostáticas. Isto é demonstrado adicionando-se sal ao sistema de partícula ionizada/agente ativo. As Figuras 8A - 8D ilustram que resistência iônica crescente em um sistema de agente ativo-

micropartícula de FDKP reduziu a adsorção do agente ativo sobre a micropartícula.

Uma série de amostras foi preparada em pH 5,0 onde a adsorção do agente ativo em superfícies de micropartícula de FDKP é forte. Cada amostra continha uma quantidade diferente de sal (cloreto de sódio), como indicado sob cada bar nas Figuras 8A - 8D (unidades são mM). O agente ativo foi misturado na suspensão para produzir uma concentração final de 5 mg/mL de micropartículas de FDKP e 0,75 mg/mL de insulina (um excesso; Figura 8A). Depois de uma breve incubação, agente ativo não ligado foi removido através de filtração e as partículas com o agente ativo adsorvido foram redissolvidas. A quantidade de agente ativo e partícula recuperada foi quantificada através de HPLC, e expressa como uma relação de massa (% de carregamento). As Figuras 8A - 8D ilustram que resistência iônica crescente em um sistema de agente ativo-micropartícula de FDKP reduziu a extensão de adsorção de agentes ativos incluindo anticorpo monoclonal anti-SSX-2₄₁₋₄₉ (0,2 mg/mL; Figura 8B), grelina (0,1 mg/mL; Figura 8C) e PTH (0,25 mg/mL; Figura 8D) na presença de 5 mg/mL de micropartículas de FDKP.

A Figura 8 mostra uma correlação inversa entre a adsorção medida e a concentração de sal na suspensão de carregamento. Isto pode ser interpretado como evidência que o sal competiu com o agente ativo para interação com a superfície de partícula. Quando a concentração de sal foi aumentada, ela competiu fortemente e eficazmente para sítios de ligação de superfície, e essencialmente deslocou o agente

ativo das superfícies de partícula. É da mesma forma especulado, que ligação de diminuição do agente ativo à micropartícula pode ser atribuível a proteção de Debye.

A menos que de outra maneira indicado, todos os
5 números expressando quantidades de ingredientes, propriedades tais como peso molecular, condições de reação, e assim sucessivamente empregados na especificação e reivindicações serão entendidos como sendo modificados em todos os exemplos pelo termo "cerca de". Desta maneira, a menos que indicado
10 ao contrário, os parâmetros numéricos mencionados na seguinte especificação e reivindicações anexas são aproximações que podem variar, dependendo das propriedades desejadas procuradas ser obtidas pela presente invenção. No mínimo, e não como uma tentativa de limitar o pedido da doutrina de
15 equivalentes ao escopo das reivindicações, cada parâmetro numérico deve pelo menos ser interpretado levando em consideração o número de dígitos significantes informados e aplicando-se técnicas de arredondamento ordinárias. Apesar das faixas numéricas e parâmetros que mencionam o amplo escopo
20 da invenção sejam aproximações, os valores numéricos mencionados nos exemplos específicos são relatados quanto precisamente possível. Qualquer valor numérico, entretanto, inerentemente contém certos erros necessariamente resultantes do desvio padrão encontrado em suas medidas de teste respec-
25 tivas.

Os termos "um" e "uma" e "o" e referentes similares empregados no contexto da descrição da invenção (especialmente no contexto das seguintes reivindicações) devem ser

interpretados para abranger igualmente o singular e o plural, a menos que de outra maneira indicado aqui ou claramente contradito através do contexto. Recitação de faixas de valores aqui é meramente pretendida servir como um método de taquigrafia de referir-se individualmente a cada valor separado que inclui-se na faixa. A menos que de outra maneira indicado aqui, cada valor individual está incorporado na especificação como se fosse individualmente relacionado aqui. Todos os métodos descritos aqui podem ser realizados em qualquer ordem adequada a menos que de outra maneira indicado aqui ou de outra maneira claramente contradita através do contexto. O uso de qualquer e todos os exemplos, ou linguagem exemplar (por exemplo "tal como") fornecido aqui está meramente destinado a melhor esclarecer a invenção e não propõe uma limitação no escopo da invenção de outra maneira reivindicada. Nenhuma linguagem na especificação deve ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado essencial para a prática da invenção.

O uso do termo "ou" nas reivindicações é empregado para significar "e/ou" a menos que explicitamente indicado a referir-se apenas às alternativas ou as alternativas são mutuamente exclusivas, embora a descrição suporte uma definição que refere-se apenas às alternativas e "e/ou."

Agrupamentos de elementos alternativos ou modalidades da invenção descritos aqui não devem ser interpretados como limitações. Cada membro de grupo pode ser referido e reivindicado individualmente ou em qualquer combinação com outros membros do grupo ou outros elementos encontrados a-

qui. É antecipado que um ou mais membros de um grupo pode ser incluído em, ou deletado de, um grupo por motivo de conveniência e/ou possibilidade de patentear. Quando qualquer tal inclusão ou deleção ocorre, a especificação é aqui julgada conter o grupo quando modificado desse modo realizando a descrição escrita de todos os grupos de Markush empregados nas reivindicações anexas.

Modalidades preferidas desta invenção são descritas aqui, incluindo a melhor maneira conhecida pelos inventores de realizar a invenção. É claro, variações nessas modalidades preferidas tornar-se-ão evidentes por aqueles de experiência ordinária na arte ao ler a descrição anterior. O inventor espera que os técnicos versados empreguem tais variações quando apropriado, e os inventores planejam para a invenção ser praticada de outra maneira do que especificamente descrita aqui. Desta maneira, esta invenção inclui todas as modificações e equivalentes da matéria objeto relacionados nas reivindicações anexadas até aqui como permitido por lei aplicável. Além disso, qualquer combinação dos elementos descritos acima em todas as possíveis variações é abrangida pela invenção a menos que de outra maneira indicado aqui ou de outra maneira claramente contradito através do contexto.

Além disso, numerosas referências foram feitas às patentes e publicações impressas ao longo desta especificação. Cada uma das referências citadas acima e publicações impressas está incorporada aqui individualmente através de referência em sua totalidade.

Além disso, deve ser entendido que as modalidades da invenção descritas aqui são ilustrativas dos princípios da presente invenção. Outras modificações que podem ser empregadas estão dentro do escopo da invenção. Desse modo, 5 por meio de exemplo, porém não de limitação, configurações alternativas da presente invenção podem ser utilizadas de acordo com os ensinamentos aqui. Desta maneira, a presente invenção não está limitada àquela como mostrado e descrito.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de revestir uma micropartícula cristali-
na pré-formada em suspensão com um agente ativo,
CARACTERIZADO pelo fato de compreender:

5 i) ajustar a interação energética entre o agente a-
tivo e a micropartícula cristalina independente da remoção
do solvente; e

ii) absorver o agente ativo sobre a superfície da
micropartícula.

10 2. Método, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de adicionalmente compreender a eta-
pa de remover ou trocar o solvente.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2,
CARACTERIZADO pelo fato de que a etapa de remover ou trocar
15 o solvente está sem efeito substancial sobre a interação en-
tre o agente ativo e a micropartícula.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de que a referida etapa de ajuste
compreende modificar as propriedades de superfície da micro-
20 partícula.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4,
CARACTERIZADO pelo fato de que a modificação das proprieda-
des de superfície da micropartícula compreende alterar as
condições da solução.

25 6. Método, de acordo com a reivindicação 5,
CARACTERIZADO pelo fato de que a alteração das condições de
solução compreende mudar o pH.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6,

CARACTERIZADO pelo fato de adicionalmente compreender a etapa de dissolver o agente ativo em uma fase fluida da suspensão de micropartículas e subseqüentemente mudar o pH da fase fluida.

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

 9. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a modificação das propriedades de superfície da micropartícula compreende alterar a polaridade da solução.

10

 10. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a modificação das propriedades de superfície da micropartícula compreende adição de íons monovalentes ou multivalentes.

15

 11. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a modificação das propriedades de superfície da micropartícula compreende a derivação química da micropartícula.

20 12. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as propriedades de superfície compreendem propriedades eletrostáticas.

 13. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as propriedades de superfície compreendem propriedades hidrofóbicas.

25

 14. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as propriedades de superfície compreendem propriedades de ligação de hidrogênio.

 15. Método, de acordo com a reivindicação 1,

CARACTERIZADO pelo fato de que a micropartícula é porosa e tem superfícies interiores acessíveis ao fluido em volume da solução.

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

17. Método, de acordo com a reivindicação 16,
CARACTERIZADO pelo fato de que a dicetopiperazina é dicetopiperazina de fumarila.

10 18. Método, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de que o método de revestir produz uma monocamada do agente ativo sobre a superfície da micropartícula.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18,
CARACTERIZADO pelo fato de que a monocamada é contínua.

15 20. Método, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente ativo na monocamada tem uma orientação preferida.

21. Método, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de que o agente ativo é insulina ou
20 um análogo de insulina.

22. Método de revestir uma micropartícula cristalina pré-formada na suspensão com insulina, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender:

i) ajustar a interação energética entre o agente a-
25 tivo e a micropartícula cristalina independente da remoção do solvente; e

ii) absorver a insulina sobre a superfície das micropartículas.

FIG.1

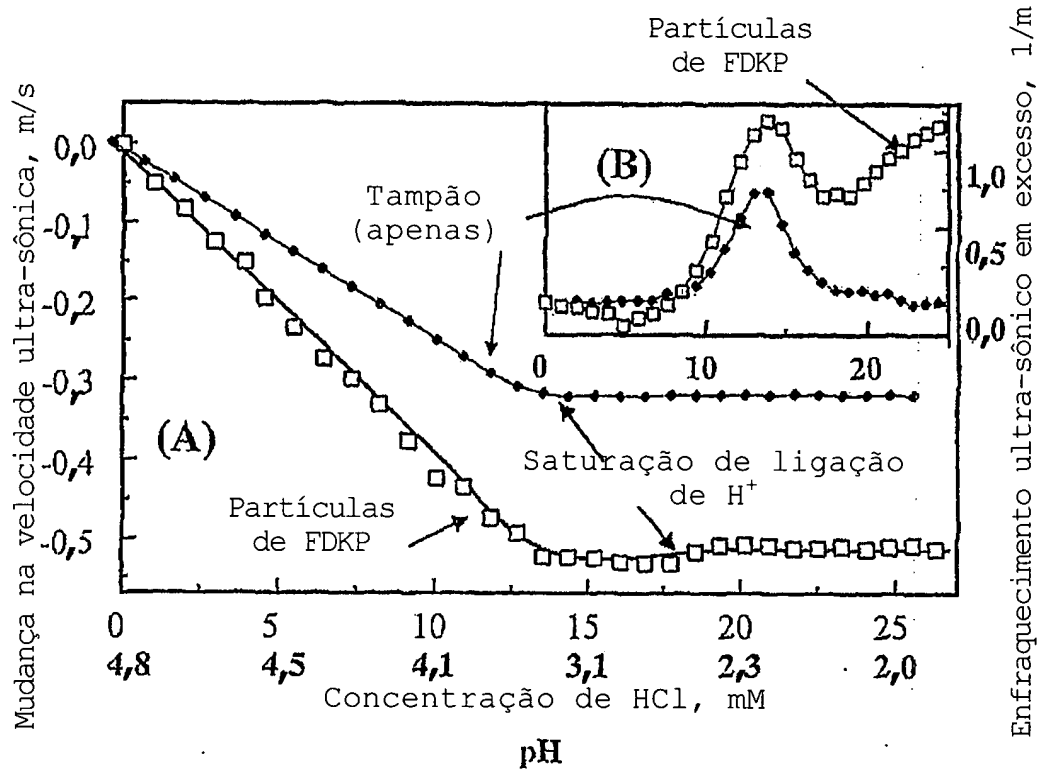


FIG. 2

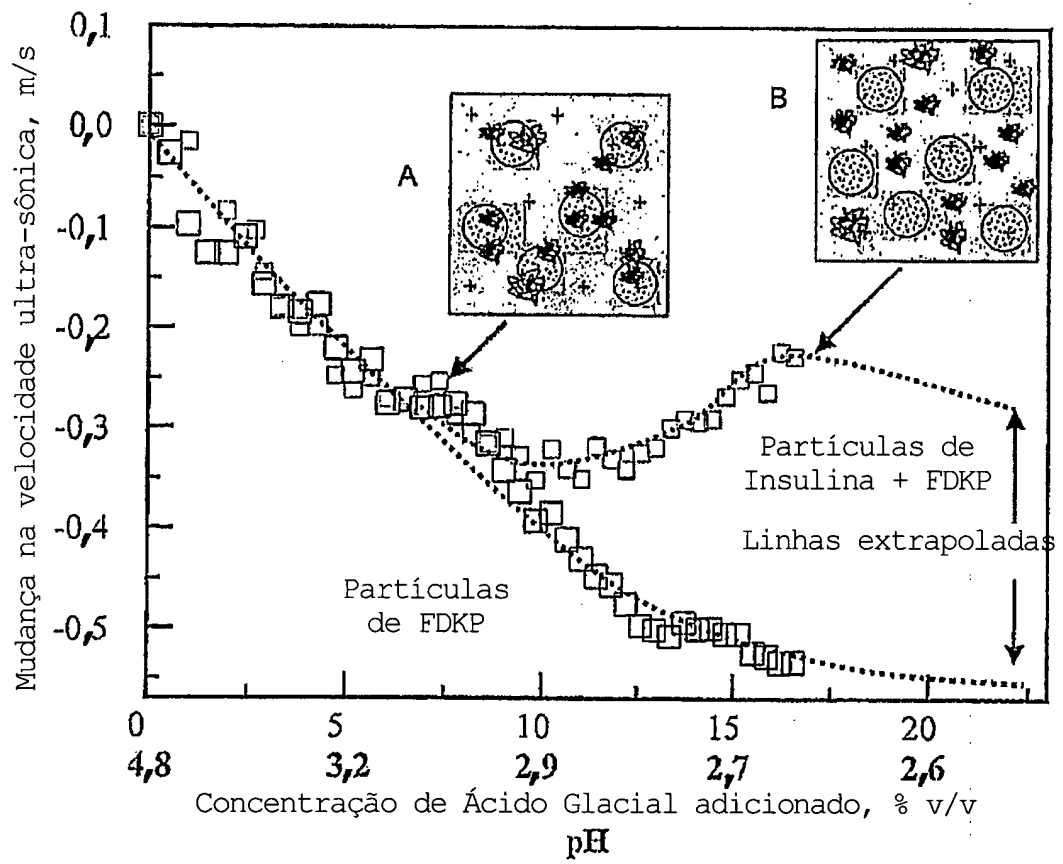


FIG. 3

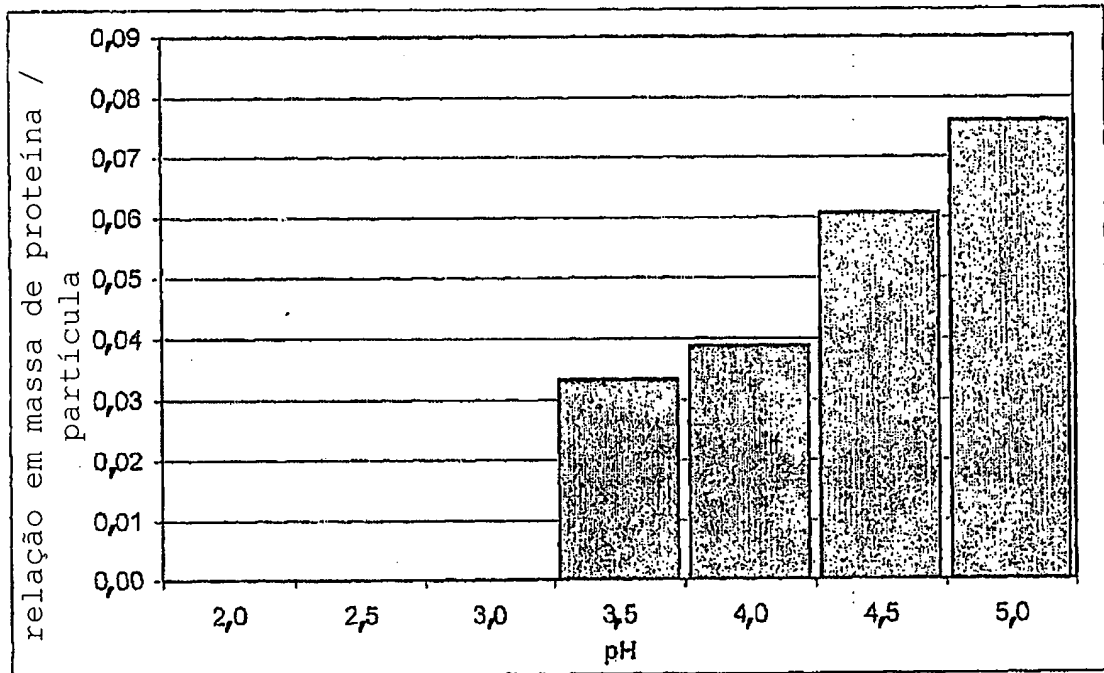
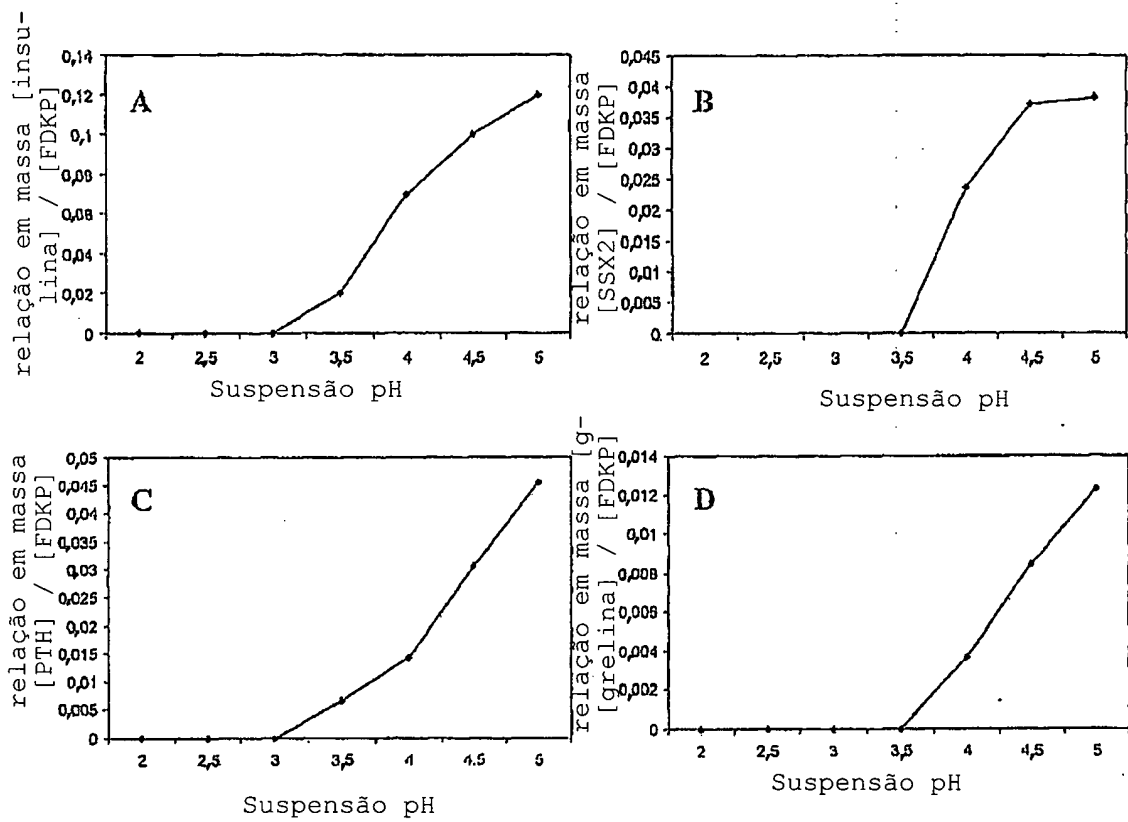


FIG. 4A-4D



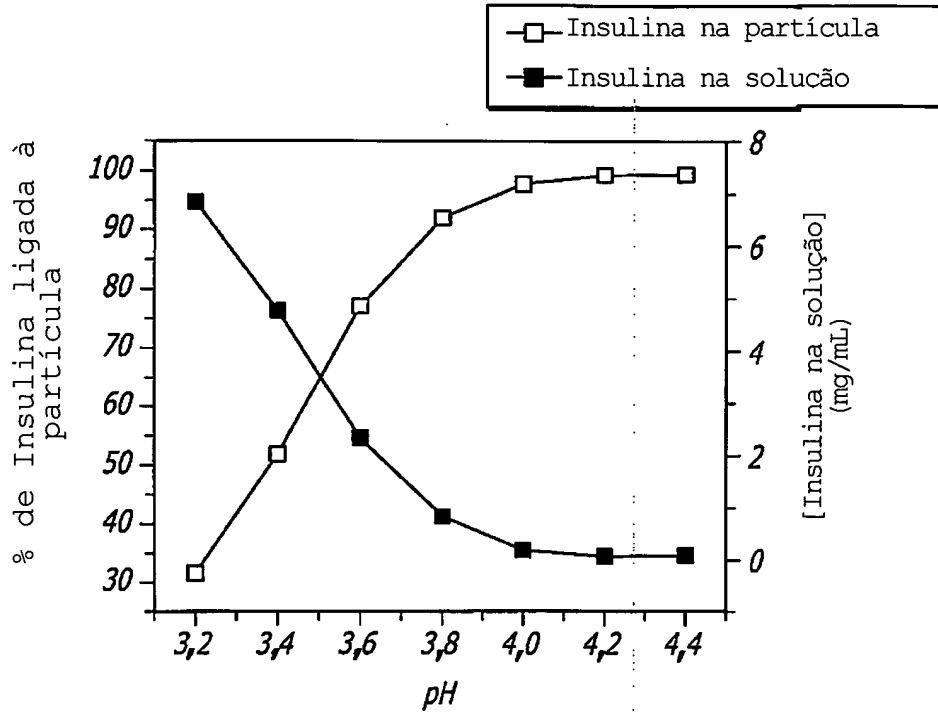


FIG. 5

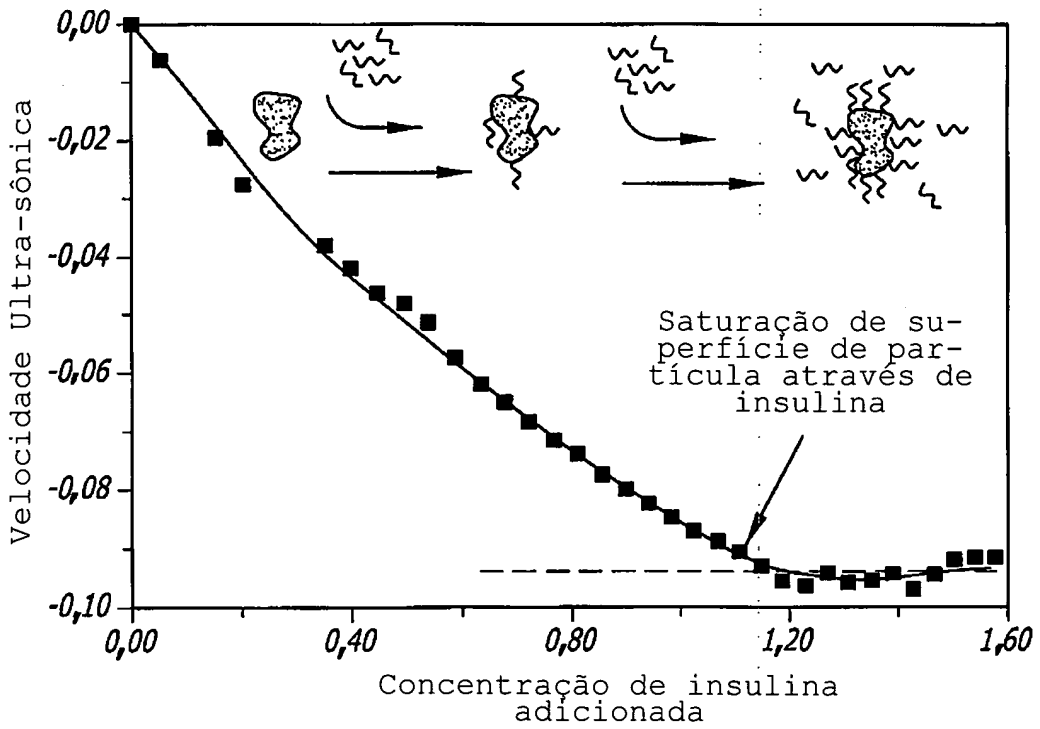


FIG. 6

FIG. 6

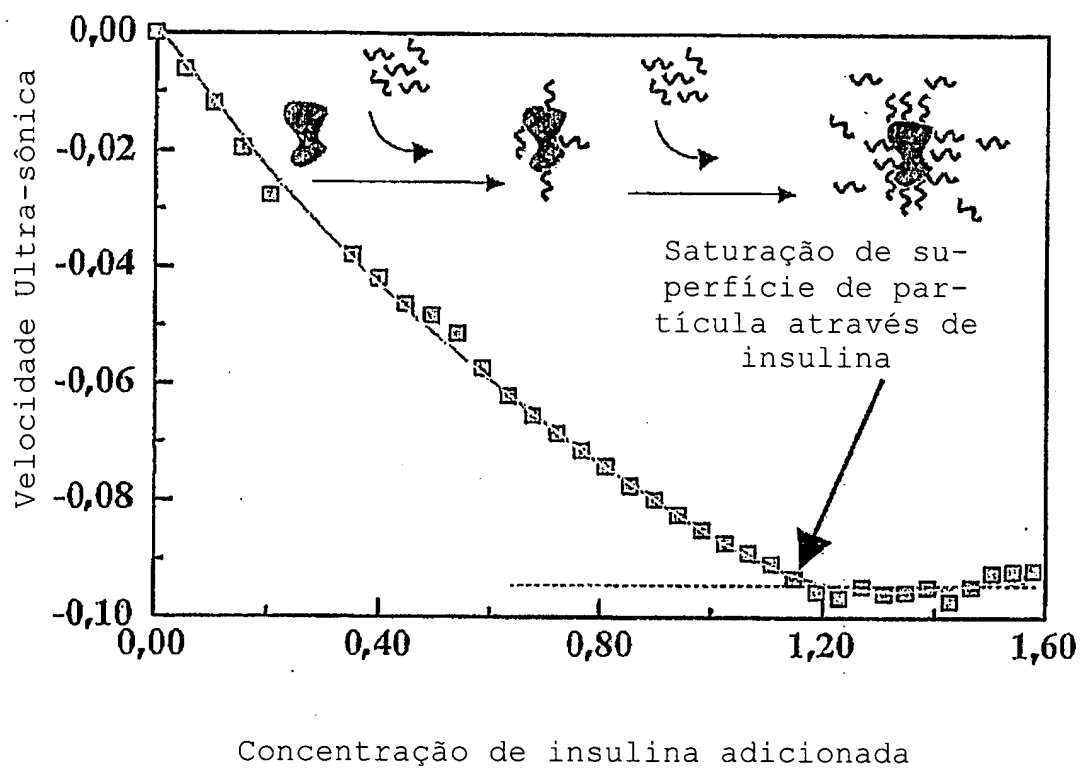


FIG. 7A-7D

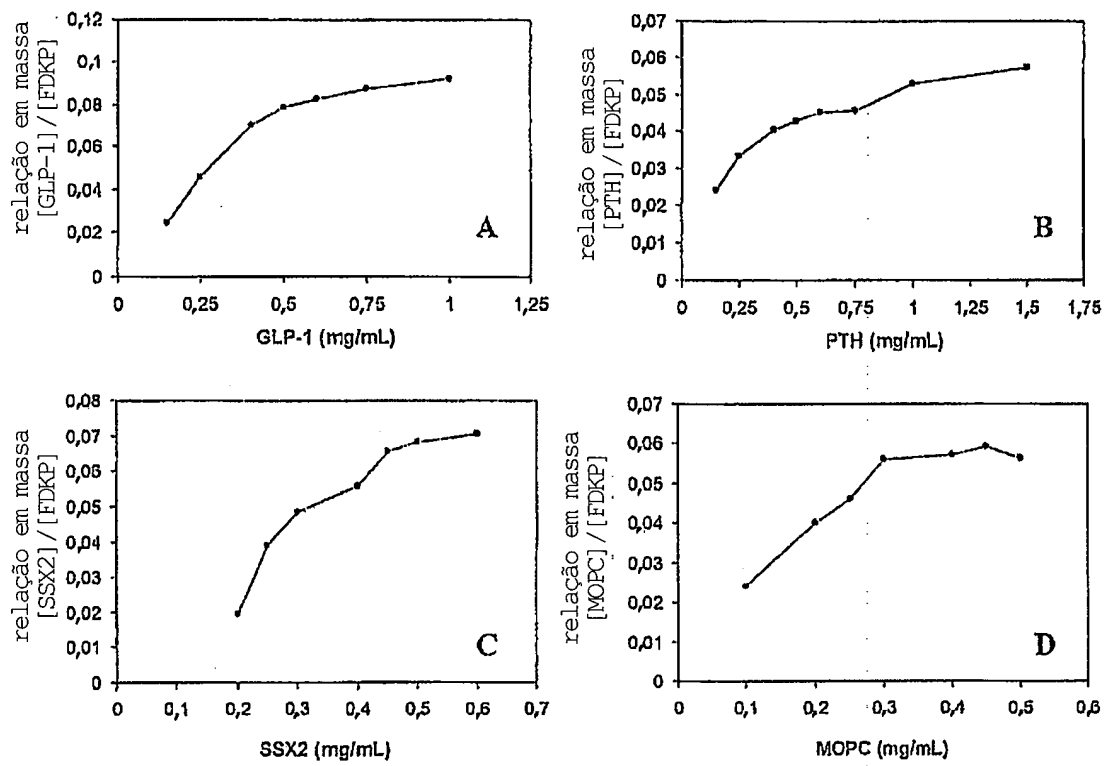
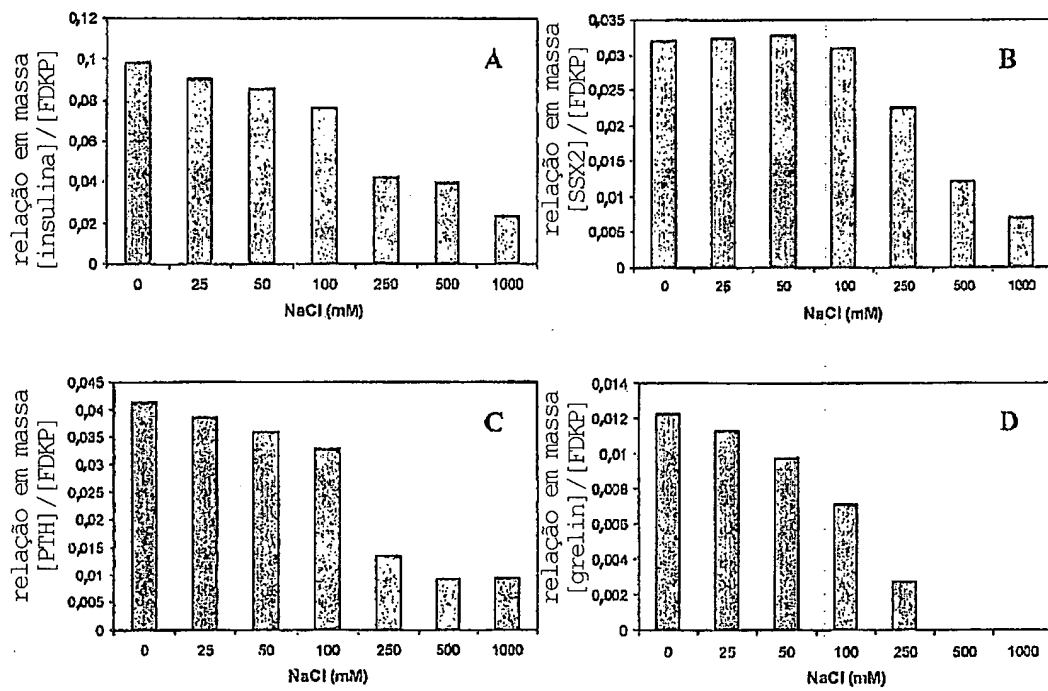


FIG. 8A-8D



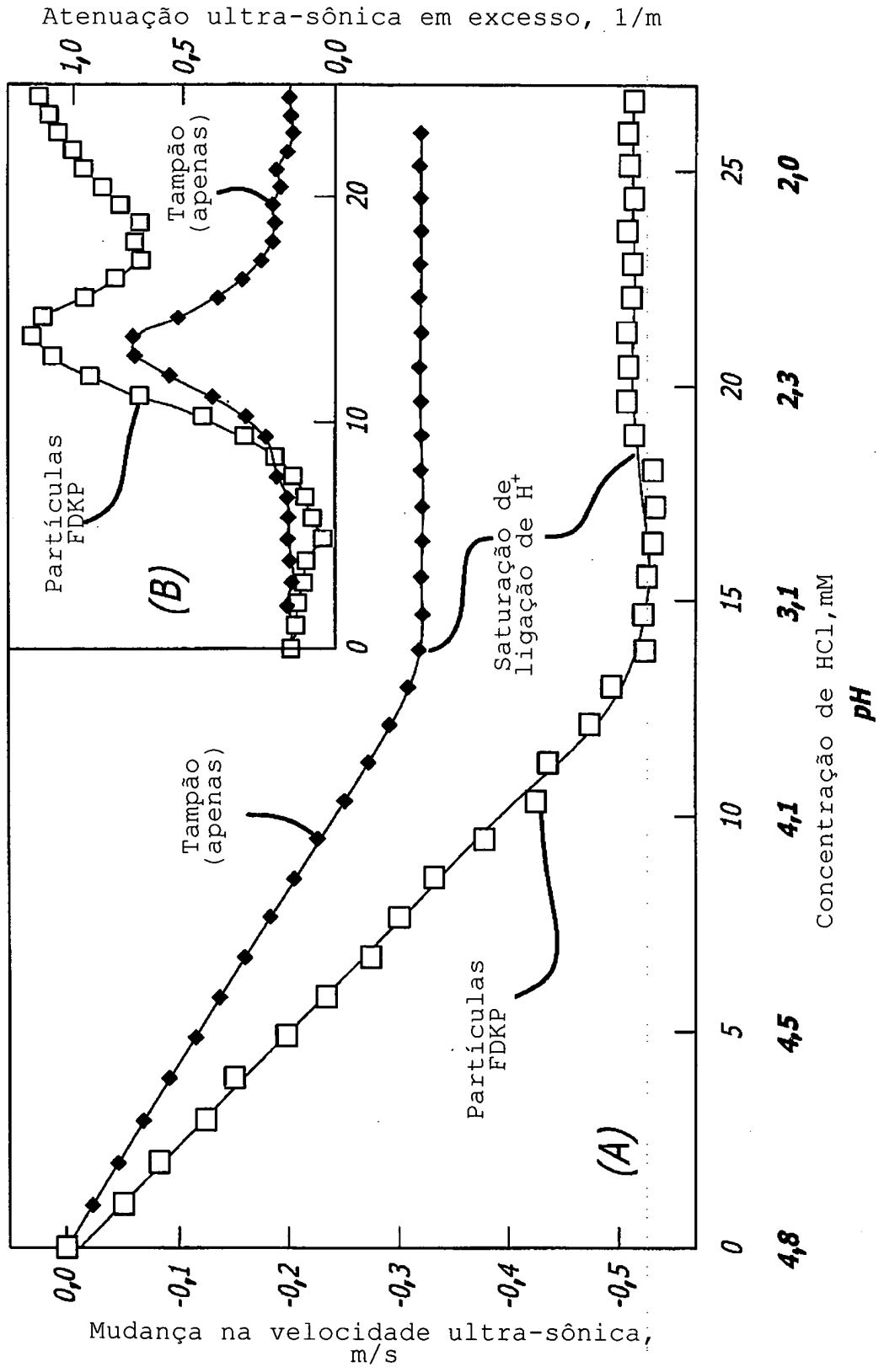
RESUMO

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

5 Métodos são fornecidos para revestir micropartículas cristalinas com um agente ativo através da alteração das propriedades de superfície das micropartículas a fim de facilitar a associação favorável na micropartícula pelo agente ativo. Tipo de propriedades de superfície que são alteradas
10 pelos métodos descritos inclui propriedades eletrostáticas, propriedades hidrofóbicas e propriedades de ligação de hidrogênio.

PÁGINAS MODIFICADAS
SUGERIDAS PELA REQUERENTE

FIG. 1



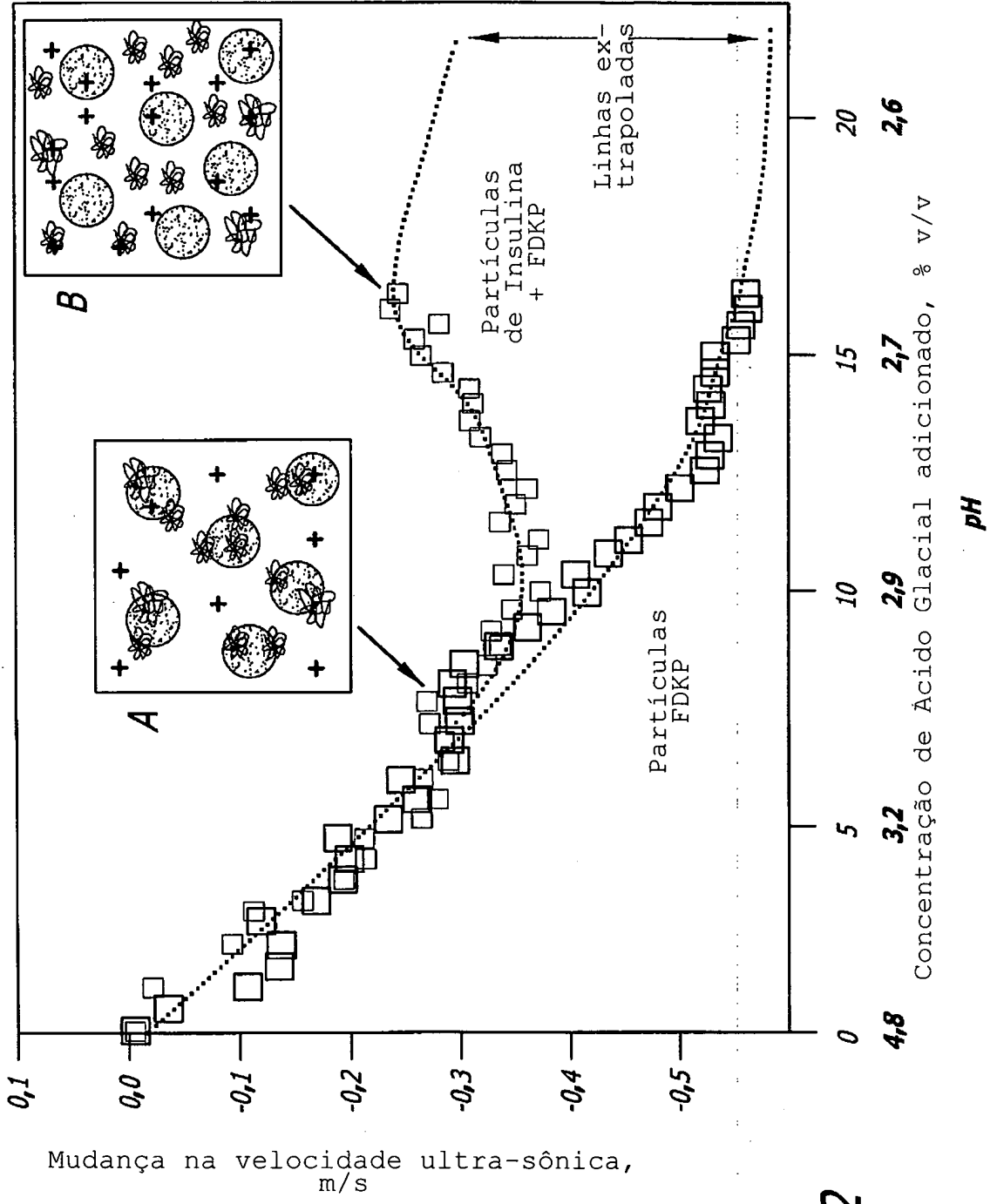


FIG. 2

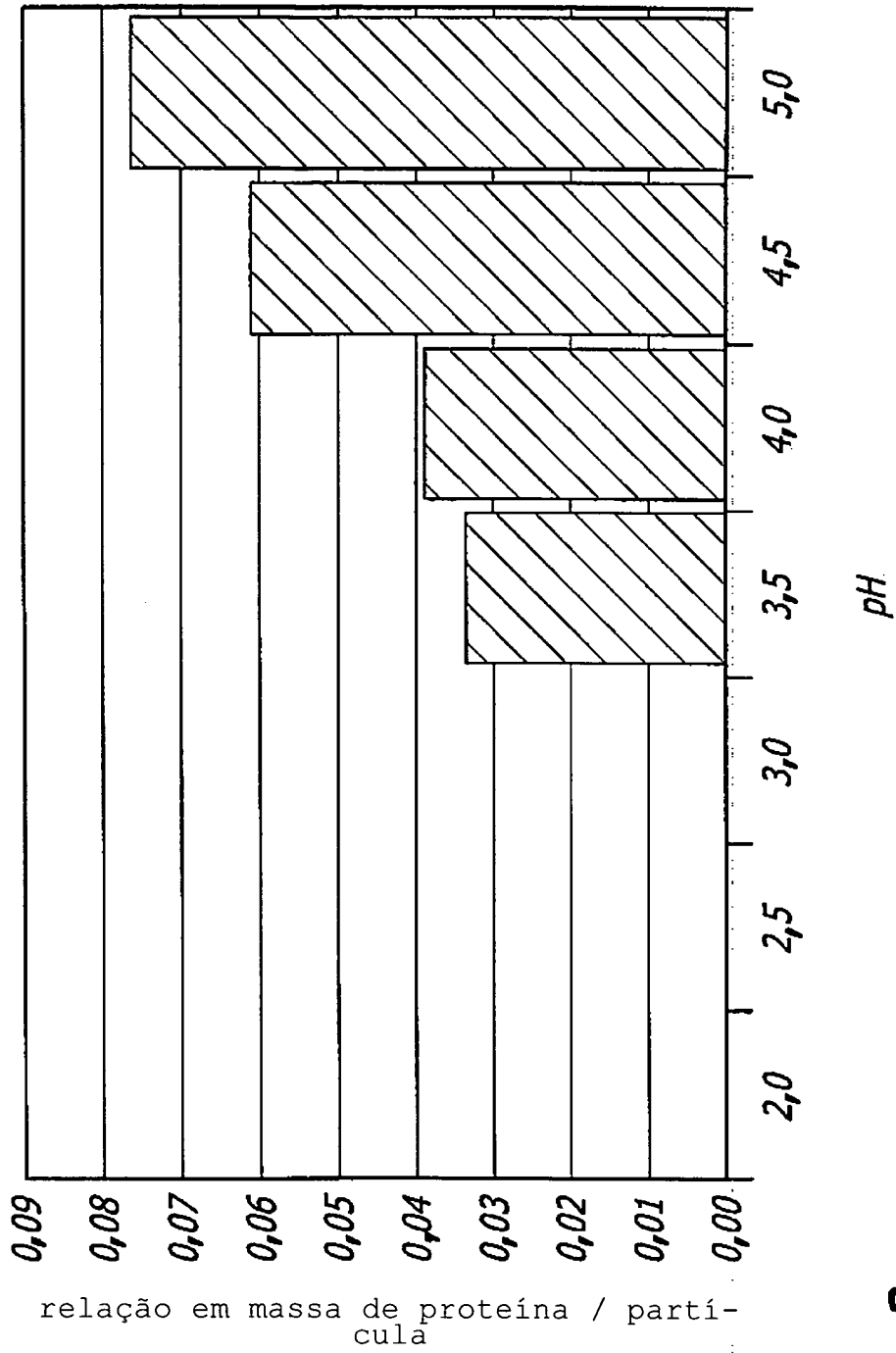


FIG. 3

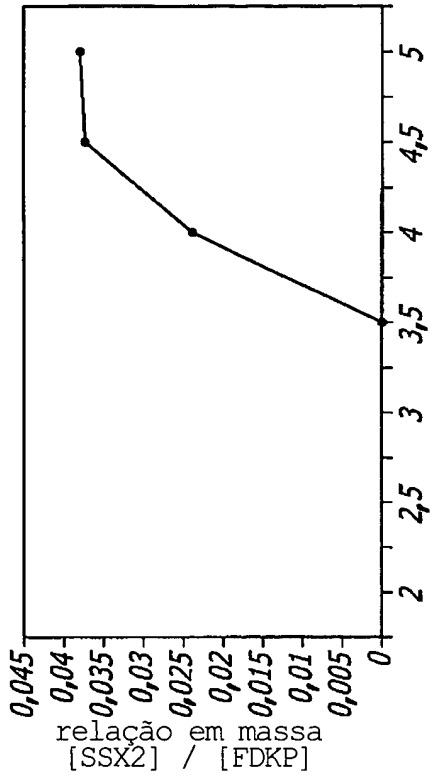


FIG. 4B

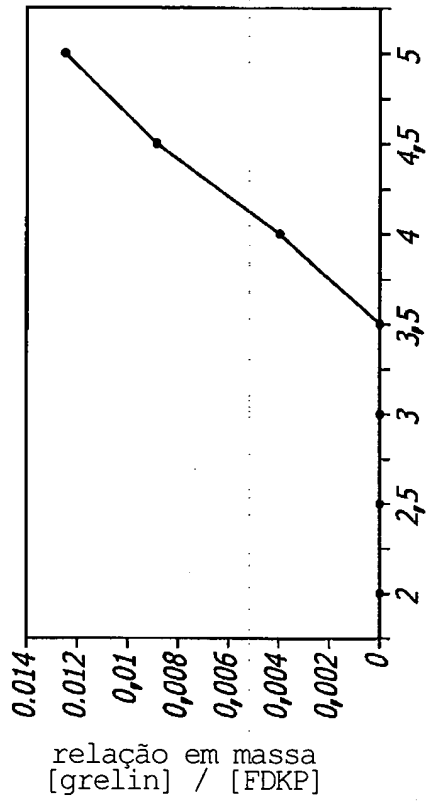


FIG. 4D

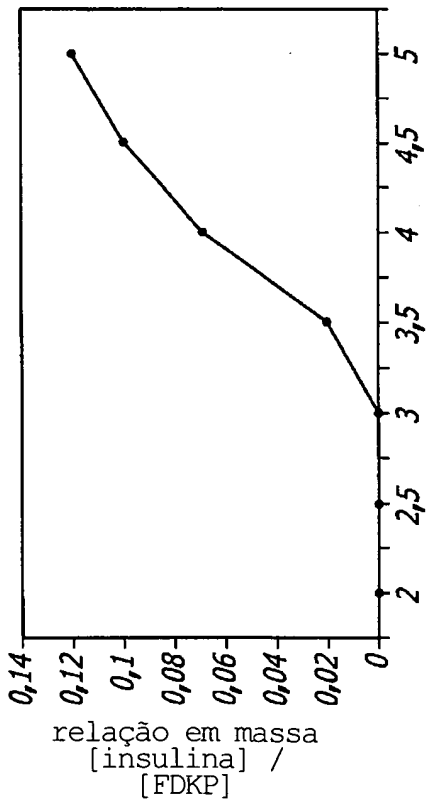


FIG. 4A

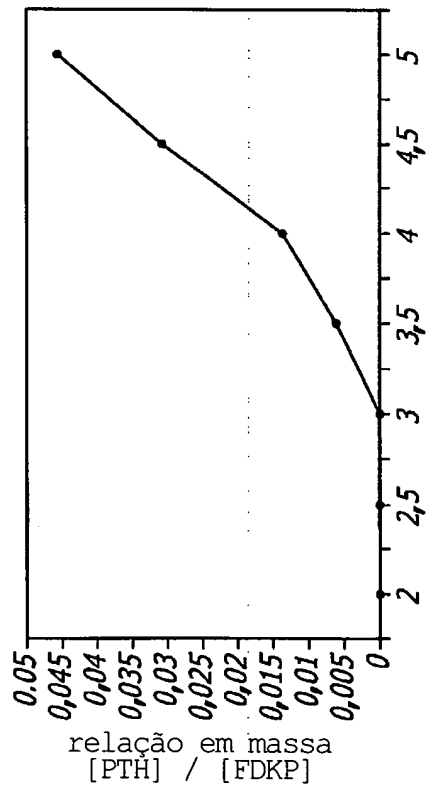


FIG. 4C

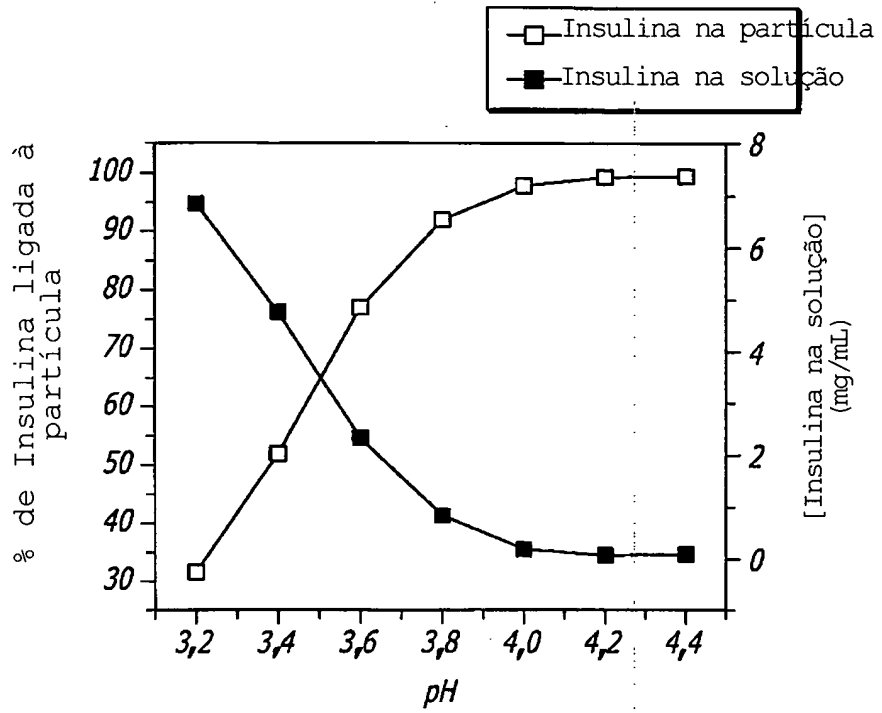


FIG. 5

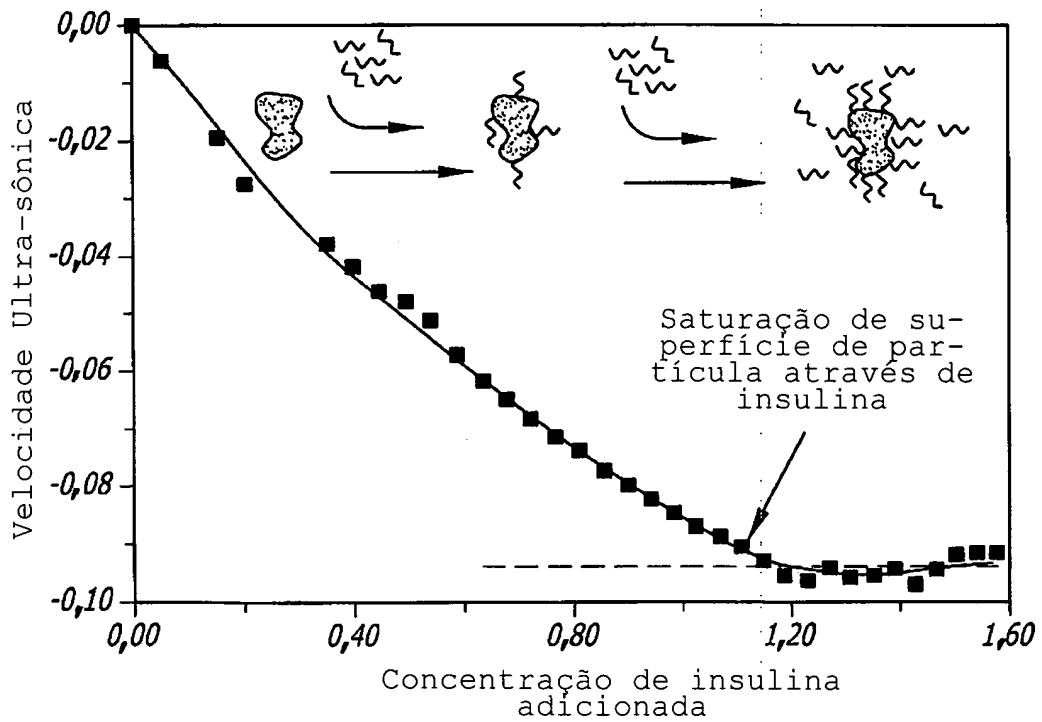


FIG. 6

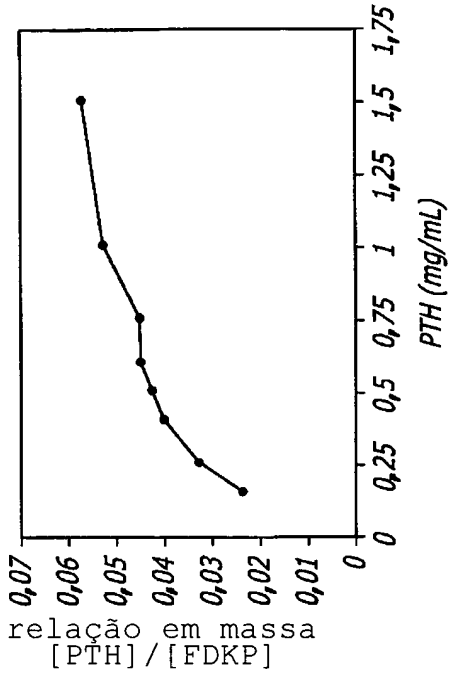


FIG. 7B

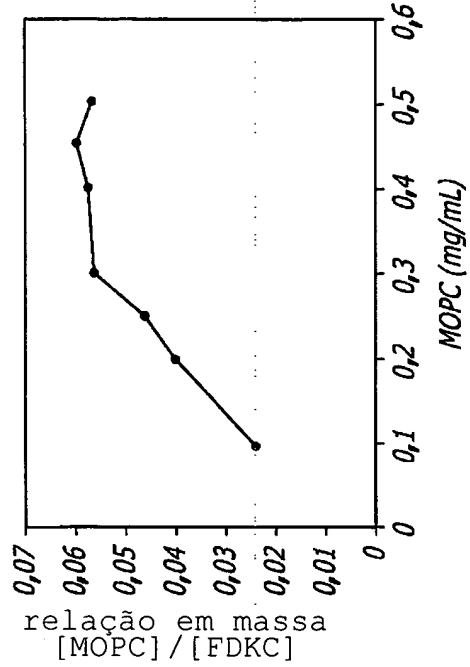


FIG. 7D

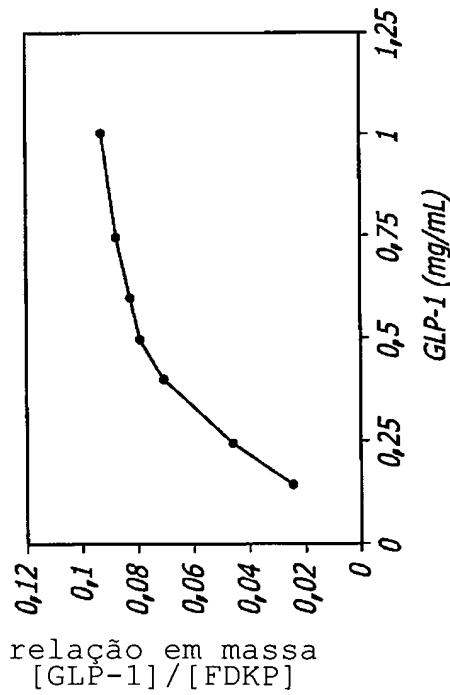


FIG. 7A

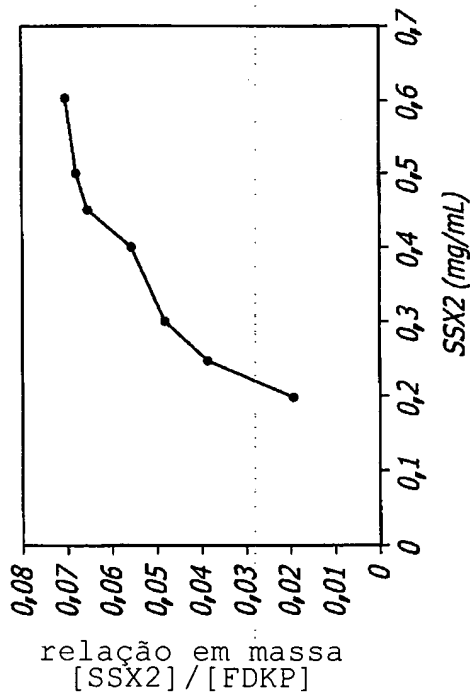


FIG. 7C

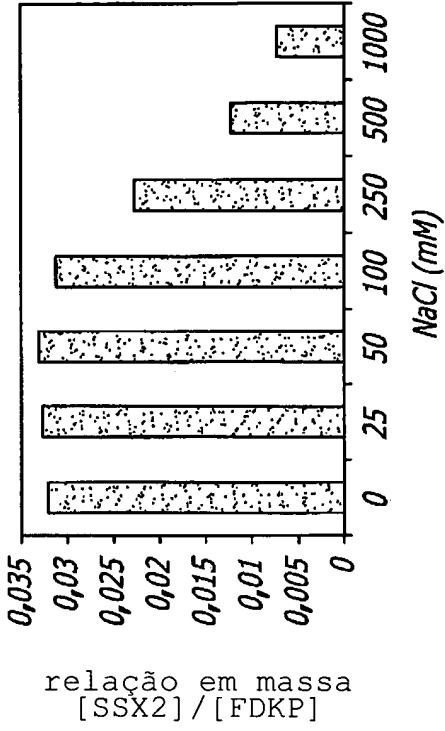


FIG. 8B

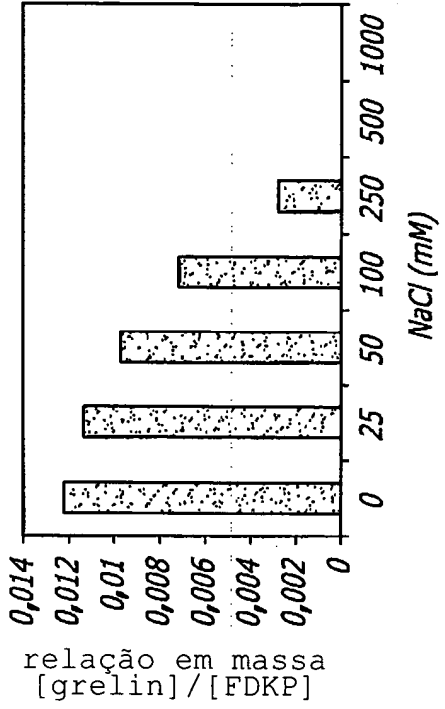


FIG. 8D

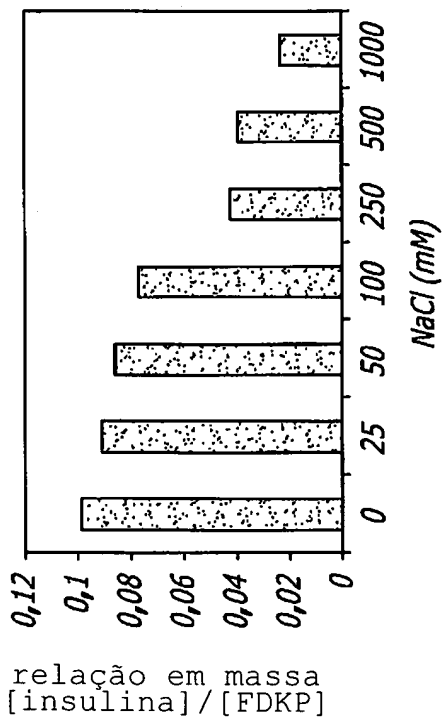


FIG. 8A

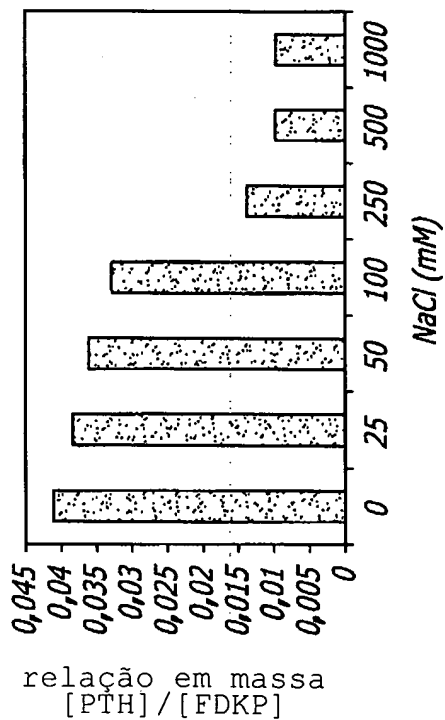


FIG. 8C

RESUMO

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

5 Métodos são fornecidos para revestir micropartículas cristalinas com um agente ativo através da alteração das propriedades de superfície das micropartículas a fim de facilitar a associação favorável na micropartícula pelo agente ativo. Tipo de propriedades de superfície que são alteradas
10 pelos métodos descritos inclui propriedades eletrostáticas, propriedades hidrofóbicas e propriedades de ligação de hidrogênio.