



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

(21) **PI 0714718-0 A2**

(22) Data de Depósito: 25/04/2007
(43) Data da Publicação: 02/01/2013
(RPI 2191)



(51) *Int.Cl.:*

A61K 38/00
A61K 9/10
A61K 38/16
A61K 38/21
A61K 38/46
A61K 39/395
A61K 47/34

(54) **Título:** POLIPEPTÍDEO FISIOLÓGICAMENTE ATIVO, MICELA POLIMÉRICA COM PROTEÍNA EM SEU INTERIOR E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DA MICELA POLIMÉRICA

(57) **Resumo:** POLIPEPTÍDEO FISIOLÓGICAMENTE ATIVO, MICELA POLIMÉRICA COM PROTEÍNA EM SEU INTERIOR E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DA MICELA POLIMÉRICA. A presente invenção refere-se a uma composição de micela polimérica, derivada de copolímero em bloco, para encapsulamento de polipeptídeo ou de proteína fisiologicamente ativo, compreendendo segmentos hidrofílicos e segmentos hidrofóbicos.

(30) **Prioridade Unionista:** 18/07/2006 JP 2006-195410

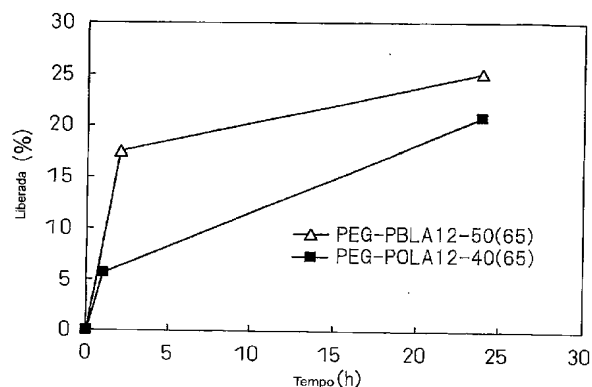
(73) **Titular(es):** Nanocarrier CO., LTD.

(72) **Inventor(es):** Miho Ohuchi, Mitsunori Harada, Yasuki Kato, Yuko Amano

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT JP2007059404 de 25/04/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/010341 de 24/01/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**POLIPEPTÍ-
DEO FISIOLÓGICAMENTE ATIVO, MICELA POLIMÉRICA COM PROTEÍ-
NA EM SEU INTERIOR E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DA MICELA
POLIMÉRICA**".

5 Campo da Técnica

A presente invenção refere-se a micelas poliméricas com alto teor de polipeptídeos ou de proteínas fisiologicamente ativos que podem ser biologicamente administradas e que permanecem estáveis *in vivo*.

Antecedentes da Técnica

10 Avanços em técnicas da engenharia genética têm permitido que inúmeros polipeptídeos e proteínas com atividade fisiológica possam ser su-
pridos em maneira estável, empregando métodos de cultura de células, para
aplicação no tratamento ou prevenção de doenças. Estes polipeptídeos, no
entanto, possuem geralmente meia-vida curta *in vivo* por sua enzimólise,
15 metabolismo e processos similares extremamente rápidos, sendo que, na
maioria dos casos, não tem sido possível obter efeitos satisfatórios quando
estes são administrados como fármacos. Um grande número de pesquisas
tem sido conduzido para resolver essa questão, com enfoque em modifica-
ção dos polipeptídeos e proteínas com polímeros ou em suas fórmulas para
20 liberação prolongada.

Por exemplo, a glicolação de polietileno é uma técnica de modi-
ficação de polímero correntemente utilizada para finalidades clínicas. O pro-
longamento da meia-vida *in vivo* foi obtido para interferon e substâncias simi-
lares, possibilitando, dessa forma, algum grau de efeito sustentado. Este
25 efeito sustentado resultou na administração menos frequente e, por conse-
quinte, redução da carga exercida sobre pacientes; contudo, estas proteínas
com polímeros modificados exibem, de modo geral, atividade mais baixa
decorrente da modificação, além de ser difícil controlar os sítios e as taxas
da modificação de maneira reprodutível.

30 Microcápsulas são também utilizadas correntemente na clínica
como uma tecnologia para liberação sustentada. Esta tecnologia é praticada
pelo uso *in vivo* do copolímero degradável formado por ácido polilácti-

co/ácido glicólico, como a base para inclusão de um fármaco em partículas finas. No entanto, o tamanho de partículas é geralmente na ordem de micrometros e não é adequado para administração intravenosa. Há relatos de microcápsulas com tamanhos de partículas reduzidos para nanotamanho cuja superfície é modificada visando controlar a sua captação e penetração no sistema retículoendotelial do fígado ou do baço após administração intravenosa (*Adv. Drug Deliv. Rev.* 17, 31-48 (1995)). Contudo, os tamanhos de partículas obtidos por esses métodos são em, no mínimo, de algumas centenas de nanômetros (*Int. J. Pharm.* 149, 43-49 (1997)), além de esta modificação de superfície ser trabalhosa e ser difícil o controle da distribuição nos órgãos de maneira reprodutível.

Lipossomos que utilizam fosfolípidios podem ser mencionados também como exemplo de tecnologia utilizada correntemente na clínica para liberação sustentada (*Pharm. Tech. Japan* 19, 99-110 (2003)). A vantagem dos lipossomos é a sua baixa toxicidade e antigenicidade, uma vez que fosfolípidios são substâncias biológicas, e o fato de que a alteração da composição lipídica torna possível o encapsulamento de inúmeras substâncias bioativas, como fármacos solúveis em água ou em gordura, macromoléculas, proteínas, ácidos nucleicos e os similares. Contudo, estes lipossomos não possuem necessariamente as propriedades adequadas para retenção de fármacos. Especificamente, as quantidades de fármacos que podem ser encapsulados por fórmula unitária de lipossomo são atualmente inadequadas e métodos mais eficientes são desejados. Ademais, as questões como estabilidade insuficiente *in vivo* e relacionadas à dificuldade da produção industrial ainda não foram satisfatoriamente superadas.

Uma das tecnologias para liberação sustentada correntemente investigada na clínica refere-se ao uso de micelas poliméricas como um recurso para resolução destas questões (*Br. J. Cancer* 93, 678-697 (2005), *Br. J. Cancer* 92, 1240-1246 (2005)). Micelas poliméricas podem ser produzidas utilizando copolímeros em bloco, compostos por polímeros hidrofílicos e polímeros hidrofóbicos. Em água, estes copolímeros em bloco formam geralmente micelas poliméricas com o núcleo compreendendo segmentos hidro-

fóbicos e, por conseguinte, exibem propriedades excelentes em termos de encapsulamento de fármaco solúvel em gordura, solubilização e liberação sustentada (Publicação de Patente-Japonesa nº 2777530).

Estas micelas poliméricas estão sendo estudadas também para
5 encapsulamento e liberação sustentada de fármacos solúveis em água. Por exemplo, um método de encapsulamento de adriamicina, como composto solúvel em água, em micelas poliméricas envolve a ligação química do fármaco às cadeias laterais do polímero hidrofóbico (Publicação de Patente Japonesa nº 2694923). Foram expostos também métodos alternativos para
10 encapsulamento eficiente por interação eletrostática introduzida entre micelas poliméricas e um peptídeo, por exemplo, um método no qual grupos funcionais com carga negativa são introduzidos nas cadeias laterais de segmentos hidrofóbicos em um copolímero em bloco, destinado a fármacos contendo substâncias carregadas eletricamente, como, por exemplo, peptídeos
15 básicos com cargas positivas (Publicação de Patente Japonesa nº 2690276), ou um método no qual um polímero biodegradável com um grupo carboxila, como ácido poliláctico ou ácido poli(láctico-co-glicólico), é adicionado (WO2005/023230). No entanto, o mesmo não pode ser aplicado a fármacos solúveis em água com pesos moleculares mais altos e, especialmente, pro-
20 teínas e polipeptídeos. A Publicação de Patente Japonesa nº 2690276 expõe exemplos de proteínas encapsuladas em micelas. No entanto, as próprias micelas não são suficientemente estáveis e, quando efetivamente administradas para o corpo, acredita-se que sofram quebra imediata porque não possuem porções hidrofóbicas e formam-se somente sob carga elétrica.

25 Um método para estabilização de micelas para encapsulamento de polieletrólitos foi exposto, em que micelas poliiônicas complexas com estrutura nuclear em concha, compostas por polieletrólitos e um copolímero em bloco contendo segmentos hidrofílicos eletricamente carregados, possuem, pelo menos, um grupo tiol contido nos segmentos eletricamente carregados
30 que constituem o núcleo, de modo que a estabilidade é promovida por ligação cruzada com pontes dissulfeto entre os segmentos eletricamente carregados, por intermédio dos grupos tiol que contêm (Publicação de Patente

Japonesa Não-Examinada (*Kokai*) nº 2001-146556). No entanto, quando efetivamente utilizadas, após administração por injeção intravenosa, as micelas dissociam-se por diluição ou interação com proteínas séricas ou sofrem interação com proteínas que contêm pontes SS em suas moléculas.

- 5 Estas interações levam à inativação das proteínas e desestabilização das micelas. Por conseguinte, este método não pode ser aplicado para grande parte das proteínas ou polipeptídeos.

A fim de aumentar os efeitos terapêuticos de polipeptídeos e de proteínas fisiologicamente ativos, é necessário prover micelas poliméricas para encapsulamento dos polipeptídeos e das proteínas fisiologicamente ativos de modo estável e eficiente, ao mesmo tempo em que permitindo a sua liberação de maneira controlada, conforme explicado acima, porém, não há atualmente esse tipo de micelas que produza baixa resposta imune e que possa ser aplicado a uma ampla gama de polipeptídeos e de proteínas fisiologicamente ativos.

Até a data atual, foram propostas também as técnicas a seguir, visando atender às especificações mencionadas acima, para que os efeitos terapêuticos de polipeptídeos e de proteínas fisiologicamente ativos pudessem ser aumentados, porém nem todas foram bem sucedidas.

20 (A) A Publicação de Patente Japonesa Não-Examinada (*Kohyo*) nº 2004-525939 refere-se a uma suspensão coloidal de nanopartículas, com base em blocos de ácido poliamino e blocos de polímero hidrofílico do tipo polialquileno-glicol, como polietilenoglicol (PEG). Uma vez que a formação de nanopartículas de fármacos (proteína ou polipeptídeo) baseia-se na ad-
25 sorção do fármaco sobre nanopartículas, a proteína ou polipeptídeo está presente sobre as superfícies das nanopartículas. Especificamente, acredita-se que o ataque por enzimas digestivas no corpo cause decomposição rápida da proteína ou de outra substância sobre a superfície das nanopartículas, resultando em sua inativação. Ademais, como os pontos isoelétricos das
30 proteínas e dos polipeptídeos a serem encapsulados não são considerados na formação das nanopartículas, a liberação pode ser relativamente rápida, tornando impossível obter-se um efeito de duração prolongada.

(B) A Publicação da Patente Européia nº EP1084172B1 refere-se à liberação de ácidos nucleicos, em especial, utilizando palmitoil poli-L-lisina polietilenoglicol ou palmitoil poli-L-ornitina polietilenoglicol, na presença de colesterol. Os menores tamanhos de partículas das partículas finas, obtidos por esta técnica, são de algumas centenas de nanômetros e, como se acumulam rapidamente no sistema reticuloendotelial após administração intravenosa, não são capazes de produzir efeitos duradouros.

(C) A Publicação de Patente Japonesa Não-Examinada (*Koka*) nº 11-269097 refere-se a partículas finas com funções como capacidade de direcionamento a órgãos e liberação sustentada, cuja base é um copolímero em bloco compreendendo um polímero biodegradável responsável por segmentos hidrofóbicos e o ácido poliamino responsável por segmentos hidrofílicos. Essa abordagem é caracterizada pelo uso de ácido poliamino biodegradável como os segmentos hidrofílicos, porém comparado a polietilenoglicol, prevê-se que possua imunogenicidade mais alta e mais interação com proteínas séricas após administração intravenosa, levando a retenção mais curta na circulação sanguínea, tornando impossível obter-se efeito de duração prolongada.

(D) USP6090925 descreve um método no qual uma solução tampão de acetato ou fosfato, contendo polietilenoglicol e polivinilpirrolidona, é adicionada a uma solução aquosa de um composto de baixo peso molecular ou peptídeo a ser encapsulado e, em seguida, é adicionado à mesma um polímero, por exemplo, albumina sérica, com ponto isoelétrico próximo do pH da solução tampão, e micropartículas são formadas por etapas de aquecimento e de resfriamento. Por incluir uma etapa de aquecimento em aproximadamente 70°C, este método não é considerado suficientemente adequado para proteínas sensíveis a calor.

Descrição da Invenção

Além de inúmeros polipeptídeos ou proteínas básicos fisiologicamente ativos, existe também um grande número de polipeptídeos e de proteínas com pontos isoelétricos de fracamente ácidos a neutros, como interferon- α , G-CSF e insulina. Atualmente, não existe uma composição de

micela polimérica que possa ser aplicada para esta ampla gama de proteínas ou peptídeos fisiologicamente ativos que permita o seu encapsulamento estável e eficiente e liberação em taxa controlada. Por conseguinte, um dos objetivos da presente invenção é prover uma composição de copolímero em bloco que satisfaça as condições mencionadas acima, bem como um método para sua produção.

Como resultado de muita pesquisa criteriosamente conduzida à luz das circunstâncias atuais explicadas acima, os presentes inventores descobriram ser possível encapsular eficientemente proteínas e polipeptídeos fisiologicamente ativos em micelas poliméricas pelo uso de um copolímero em bloco compreendendo segmentos hidrofílicos, compostos por polietilenoglicol, e segmentos hidrofóbicos compostos por um ácido poliamino, selecionado do grupo constituído por aminoácidos ácidos, derivados hidrofóbicos destes e misturas dos referidos aminoácidos ácidos e referidos derivados hidrofóbicos. Demais a mais, ao ajustarem o pH utilizado para preparar as micelas poliméricas, levando em consideração os pontos isoelétricos das proteínas e polipeptídeos fisiologicamente ativos, os inventores conseguiram obter um encapsulamento mais eficiente. Os presentes inventores completaram esta invenção ao constatarem que este método pode ser aplicado a inúmeras proteínas e polipeptídeos fisiologicamente ativos, independentemente de sua acidez ou alcalinidade, que a modificação do copolímero em bloco pode contribuir para interação hidrofóbica entre os segmentos hidrofóbicos e o polipeptídeo ou a proteína, possibilitando, dessa forma, aumentar a eficiência do encapsulamento e a taxa de liberação do fármaco e, em especial, que a estrutura das cadeias laterais hidrofóbicas no copolímero em bloco contribui significativamente para a taxa de liberação do fármaco.

A presente invenção abrange as seguintes características.

[1] Composição de micela polimérica para encapsulamento de proteínas ou polipeptídeos fisiologicamente ativos, formada por um copolímero em bloco compreendendo segmentos hidrofílicos, compostos por polietilenoglicol, e segmentos hidrofóbicos compostos por um ácido poliamino, selecionado entre aminoácidos ácidos, seus derivados hidrofóbicos e mistu-

que se m estiver presente, as unidades de (COCHNH) e de (COR₇CHNH) serão aleatórias, R₆ pode ser selecionado para cada unidade de aminoácido em um copolímero em bloco e está aleatoriamente presente, porém hidrogênio como R₆ constitui menos do que 60% do R₆ total, y representa o número inteiro 1 ou 2, L₁ representa um grupo de ligação selecionado do grupo constituído por -NH-, -O-, -O-Z-NH-, -CO-, -CH₂-, -O-Z-S-Z- e -OCO-Z-NH-, onde cada Z representa independentemente um grupo C₁-C₆ alquilenos e L₂ representa um grupo de ligação selecionado do grupo constituído por -OCO-Z-CO- e -NHCO-Z-CO-, onde Z é um grupo C₁-C₆ alquilenos.

10 [5] Composição de acordo com [4] acima, em que a taxa de formação de éster ou de amida na cadeia lateral de um ácido poliamino do copolímero em bloco é de 40-100%.

[6] Composição de acordo com qualquer um entre [1] e [5] acima, em que o ponto isoelétrico (pI) da proteína ou do polipeptídeo é de 3 a 15 11,5.

[7] Método de preparo de composição de micela polimérica de acordo com qualquer um entre [1] a [6] acima, caracterizado por compreender uma etapa de mistura do copolímero em bloco com a proteína ou polipeptídeo fisiologicamente ativo e ajuste do pH da mistura para um pH diferente do ponto isoelétrico (pI) da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo, para encapsular a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo na região do núcleo hidrofóbico de micelas compostas pelo copolímero em bloco,

25 Em que o pI da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo, o ponto isoelétrico (pI') do aminoácido ácido e/ou de seus derivados nos segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco e o pH que é diferente do pI, estão presentes na seguinte relação:

$$pI > pH > pI'$$

30 de modo que os segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco possuam carga negativa no pH, enquanto a proteína ou polipeptídeo fisiologicamente ativo possuem carga positiva.

[8] Método de acordo com [7] acima, em que o pH possui uma

diferença de, pelo menos, 1 do pl do fármaco macromolecular solúvel em água.

5 A invenção oferece a vantagem de permitir o encapsulamento eficiente de fármacos de alto peso molecular, como proteínas e polipeptídeos fisiologicamente ativos em micelas poliméricas, ao mesmo tempo em que permitindo também controle de sua taxa de liberação.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 apresenta um ciclo de tempo de liberação de IgG encapsulado em diferentes micelas poliméricas.

10 A Figura 2 apresenta um ciclo de tempo de concentração plasmática de interferon- α após administração *in vivo* de interferon- α encapsulado em diferentes micelas poliméricas.

15 A Figura 3 apresenta um ciclo de tempo de concentração plasmática de lisozima FITC marcada após administração intravenosa para ratos de lisozima FITC marcada encapsulada em micelas poliméricas ou de lisozima FITC marcada em solução.

A Figura 4 apresenta um ciclo de tempo de concentração plasmática de interferon- α após administração intravenosa para ratos de interferon- α encapsulado em micelas poliméricas ou de interferon- α em solução.

20 A Figura 5 apresenta um ciclo de tempo de concentração plasmática de interferon- α após administração intravenosa para ratos de interferon- α encapsulado em micelas poliméricas ou de interferon- α em solução.

25 A Figura 6 apresenta um ciclo de tempo de concentração plasmática de fator estimulador de colônias de granulócitos humano após administração intravenosa para ratos de fator estimulador de colônias de granulócitos humano encapsulado em micelas poliméricas ou de fator estimulador de colônias de granulócitos humano em solução.

30 A Figura 7 apresenta um ciclo de tempo de concentração plasmática de fator estimulador de colônias de granulócitos humano após administração intravenosa para ratos de fator estimulador de colônias de granulócitos humano encapsulado em micelas poliméricas ou de fator estimulador de colônias de granulócitos humano em solução.

Melhor Modo para Realizar a Invenção

De acordo com um modo preferido da invenção, é possível encapsular eficientemente proteínas ou polipeptídeos fisiologicamente ativos em micelas poliméricas utilizando um copolímero em bloco, compreendendo
5 segmentos hidrofílicos, compostos por polietilenoglicol, e segmentos hidrofóbicos compostos por um ácido poliamino selecionado do grupo constituído por aminoácidos ácidos, derivados hidrofóbicos destes e misturas dos referidos aminoácidos ácidos e dos referidos derivados hidrofóbicos.

De acordo com um outro modo preferido da invenção, é possível
10 encapsular mais eficientemente proteínas ou polipeptídeos fisiologicamente ativos nas regiões hidrofóbicas do núcleo de micelas poliméricas, compreendendo um copolímero em bloco, pelo ajuste do pH durante o preparo das micelas poliméricas com base no ponto isoelétrico (pI) da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo a ser encapsulado.

Para encapsulamento mais eficiente de proteínas ou polipeptídeos fisiologicamente ativos nas micelas poliméricas, o pH durante o preparo das micelas poliméricas é ajustado, de preferência, para um valor diferente do pI dos polipeptídeos ou proteínas. O pH durante o preparo das micelas poliméricas difere e, mais especificamente, difere de preferência em pelo
20 menos 1, do pI da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo, em um intervalo em que não ocorra desnaturação da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo. Para um encapsulamento ainda mais eficiente da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo, a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo possui, de preferência, carga elétrica oposta àquela
25 dos segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco, ou seja, as seções que formam o núcleo das micelas poliméricas, no pH durante o preparo das micelas poliméricas. Por exemplo, se a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo possuir carga positiva no pH durante o preparo das micelas poliméricas, os segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco terão, de preferência, carga negativa, e se a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente
30 ativo possuir carga negativa, os segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco terão, de preferência, carga positiva. De acordo com um modo preferi-

do, por exemplo, se o pI da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo, o ponto isoelétrico (pI') do aminoácido ácido e/ou de seus derivados nos segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco e o pH durante o preparo das micelas poliméricas for na seguinte relação:

5
$$pI > pH > pI'$$

os segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco terão carga negativa e a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo terá carga positiva naquele pH . Os pontos isoelétricos dos aminoácidos ácidos, o ácido aspártico e ácido glutâmico, são 2,77 e 3,22, respectivamente.

10 De acordo com um outro modo preferido da invenção, a especificação do pI da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo permite selecionar os segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco e determinar apropriadamente o pH durante o preparo das micelas poliméricas, conforme adequado para as condições, de modo que possa se aplicar a diferentes

15 proteínas e polipeptídeos fisiologicamente ativos exibindo ampla gama de valores de pI . Por exemplo, quando se desejar encapsular um polipeptídeo ou proteína com pI básico, é selecionado um copolímero em bloco de modo que o pI' do aminoácido ácido e/ou de seus derivados nos segmentos hidrofóbicos seja ainda mais ácido do que o pI , e é efetuada uma seleção apropriada de pH entre os valores do pI e pI' para formação das micelas naquele

20 pH , para que um encapsulamento eficiente possa ser obtido. Por outro lado, quando se desejar encapsular um polipeptídeo ou proteína com pI ácido, é selecionado um copolímero em bloco de modo que o pI' seja ainda mais ácido ou ainda mais básico do que o pI , e é efetuada uma seleção apropriada de pH entre os valores do pI e pI' para formação das micelas naquele

25 pH , para que um encapsulamento eficiente possa ser obtido. De preferência, os segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco da invenção possuem grupos funcionais com carga negativa em um intervalo neutro, como em pH 5-8. Utilizando este copolímero em bloco, um pH em intervalo neutro pode ser

30 selecionado como o pH durante a formação de micelas e para evitar a exposição do polipeptídeo ou da proteína a um meio extremamente ácido ou básico.

Ao se considerar o pH durante o preparo das micelas poliméricas, o pI da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo e o pI' do aminoácido ácido e/ou de seu derivado nos segmentos hidrofóbicos, o encapsulamento da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo nas micelas poliméricas pode ser obtido pelo preparo de uma mistura aquosa do copolímero em bloco que formará as micelas poliméricas e da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo a ser encapsulado, e o pH da mistura é ajustado para um pH apropriadamente selecionado com base no pI do fármaco e no pI' do aminoácido ácido e/ou de seu derivado nos segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco, conforme explicado acima.

De acordo com um modo preferido, o copolímero em bloco é dissolvido em um solvente orgânico apropriado, por exemplo, um solvente orgânico não-miscível em água como diclorometano, clorofórmio, dietil éter, dibutil éter, acetato de etila ou acetato de butila, um solvente orgânico miscível em água como metanol, etanol, álcool propílico, álcool isopropílico, sulfóxido de dimetila, dimetilformamida, dimetilacetamida, acetonitrila, acetona ou tetra-hidrofurano, ou uma mistura destes. Opcionalmente, a solução pode ser secada ao ar até a formação de um filme sólido sob corrente de gás nitrogênio, por exemplo, e o solvente orgânico é removido, se necessário, durante secagem sob pressão negativa. Uma solução aquosa do fármaco macromolecular solúvel em água a ser encapsulado é adicionada, em seguida, e misturada ao copolímero em bloco que foi tratado. Finalmente, o pH da mistura é ajustado lentamente até o desejado para formar micelas poliméricas, ao mesmo tempo em que a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo é encapsulado nas mesmas.

As micelas poliméricas podem ser formadas, por exemplo, agitando-se uma mistura do copolímero em bloco e da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo. A formação das micelas poliméricas é conduzida, de preferência, com aplicação de energia, por exemplo, sonicação. Quando se utiliza sonicação, a formação pode ser obtida com Biodisruptor (Nippon Seiki Co., Ltd.), por exemplo, em Nível 4, ao mesmo tempo em que resfriando em gelo. O tempo de exposição não é especialmente restringido, desde

que não leve à desnaturação da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo, e pode ser em intervalos de 1 segundo durante 5 segundos – 10 minutos, de preferência, 5 segundos - 2 minutos.

De acordo com um outro modo preferido, o copolímero em bloco
5 seco pode ser tratado com argamassa ou substância similar para se transformar em pó homogêneo, e a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo em forma em pó, ou a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo dissolvido em uma pequena quantidade de solução que pode ser adicionada e misturada suavemente ao mesmo, após o qual uma solução tampão adequada
10 pode ser adicionada e misturada aos mesmos por entre 2 e 24 horas, antes de tratamento ultrassônico.

De acordo com ainda um outro modo preferido, micelas vazias são preparadas inicialmente e, em seguida, a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo é adicionado, com agitação ou colocação, para obtenção
15 da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo encapsulado em micelas poliméricas. Especificamente, uma solução tampão adequada pode ser adicionada ao copolímero em bloco e submetida a tratamento ultrassônico para preparo de micelas vazias, conforme mencionado acima, e, em seguida, a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo dissolvido na mesma
20 solução tampão ou a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo diluído na solução tampão pode ser adicionado às mesmas e a mistura agitada com agitador ou colocada suavemente. O período de tempo para agitação ou colocação é, de preferência, entre 2 e 24 horas, e a temperatura, de preferência, de 4°C a 30°C, sendo o mais preferível, de 4°C. Este método é vantajoso
25 do ponto de vista de estabilidade da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo, visto que a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo não é submetido a tratamento ultrassônico. Em qualquer caso, a solução tampão adequada é, de preferência, uma que atenda à relação supramencionada entre pI e pH .

De acordo com o método da invenção, não há restrições especiais
30 sobre proteínas ou polipeptídeos fisiologicamente ativos que possam ser eficientemente encapsulados nas micelas poliméricas, porém, de preferên-

cia, as proteínas ou polipeptídeos fisiologicamente ativos são solúveis em água e com pesos moleculares de, pelo menos, 1.500 e, de preferência, de pelo menos 2.000. Exemplos de proteínas e polipeptídeos fisiologicamente ativos que podem ser mencionados incluem interferon- α , β e γ , eritropoietina, 5 G-CSF, hormônio de crescimento, interleucinas, TNF, fator estimulador de colônias de leucócito-macrófago granular, fator estimulador de colônias de macrófago, fator de crescimento de hepatócito, a superfamília de TGF- β , EGF, FGF, IGF-I e os similares. Naturalmente, estão incluídos também derivados das proteínas supramencionadas, como aquelas com uma ou mais 10 substituições, adições ou deleções de aminoácidos, desde que a sua atividade não seja comprometida.

A proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo exibirá pontos isoelétricos diferentes, mesmo com a mesma proteína, dependendo da presença de cadeias de açúcar ou sua estrutura em ordem mais alta, especialmente 15 quando produzida por recombinação gênica. Por conseguinte, ao se preparar micelas poliméricas levando em consideração o pH durante o seu preparo, o pI da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo e o pI' do aminoácido ácido e/ou de seu derivado nos segmentos hidrofóbicos, é preferível estabelecer o pH durante o encapsulamento após determinar o ponto 20 isoelétrico da proteína ou do polipeptídeo a ser encapsulado, empregando eletroforese para essa determinação.

A quantidade de proteína ou polipeptídeo fisiologicamente ativo utilizada para formação de micelas não é especialmente restringida, porém será geralmente de 0,01-50% por peso e, de preferência, de 0,1-10% por 25 peso relativo ao peso do fármaco macromolecular solúvel em água em relação ao copolímero em bloco.

Polímeros que podem ser utilizados para formar micelas poliméricas para encapsulamento de fármaco, de acordo com a invenção, são copolímeros em bloco compreendendo segmentos hidrofílicos, compostos por 30 polietilenoglicol, e segmentos hidrofóbicos compostos por um ácido poliamino selecionado do grupo constituído por aminoácidos ácidos, derivados hidrofóbicos destes e misturas dos referidos aminoácidos ácidos e os referidos

derivados hidrofóbicos, dos quais um tipo pode ser um segmento hidrofóbico com grupo funcional com carga. "Segmento hidrofóbico com grupo funcional com carga" significa que o segmento, como um todo, possui a hidrofobicidade necessária para formar o núcleo das micelas poliméricas compostas pelo copolímero em bloco, e que a hidrofobicidade é decorrente de seções hidrofóbicas presentes aleatoriamente nos segmentos, contendo porções com carga negativa presentes também no segmento.

Os segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco da invenção são capazes de manter firmemente o fármaco macromolecular a ser encapsulado por interação hidrofóbica e, quando os segmentos hidrofóbicos possuem carga elétrica, podem manter também o fármaco macromolecular por meio de interação eletrostática. Os presentes inventores constataram que a estrutura dos grupos hidrofóbicos nos segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco pode controlar a interação hidrofóbica entre a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo encapsulado e o copolímero em bloco, possibilitando, dessa forma, o controle da taxa de liberação. Embora não tenham pretendido ficarem limitados a qualquer teoria em particular, os inventores acreditam que, conforme será demonstrado pelos exemplos que seguem, a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo é mantido mais firmemente nos núcleos das micelas se a estrutura dos grupos hidrofóbicos introduzidos nos segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco, formador das micelas, for uma estrutura linear de grupos alquila em vez de estrutura em plano, como a de benzila ou fenila, sendo, por conseguinte, liberado por um período mais prolongado de tempo. Em outras palavras, modificando-se a estrutura dos grupos hidrofóbicos introduzidos nos segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco, é possível ajustar a taxa de liberação da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo. Por exemplo, quando se desejar obter uma taxa mais alta de liberação de fármaco, a introdução de grupos hidrofóbicos com estrutura em plano, como benzila ou fenila, pode ser aumentada, e se o desejado for uma taxa mais baixa de liberação de fármaco, a introdução de grupos hidrofóbicos com estrutura linear, como grupos alquila, pode ser aumentada. Quando uma taxa intermediária de liberação de

fármaco for desejada, a razão entre introdução de grupos hidrofóbicos com estrutura em plano, como benzila ou fenila, e de grupos hidrofóbicos com estrutura linear, como grupos alquila, pode ser variada para ajustar apropriadamente a taxa de liberação.

5 A seguir são apresentados exemplos de copolímeros em bloco que podem ser utilizados na invenção.

Os segmentos hidrofílicos são compostos por poli(etilenoglicol) [ou poli(óxido de etileno)] e podem incluir opcionalmente segmentos derivados de polissacarídeos, poli(vinilpirrolidona), poli(vinil álcool), poli(acrilamida), poli(ácido acrílico), poli(metacrilamida), poli(ácido metacrílico), poli(ésteres de ácido metacrílico), poli(ésteres de ácido acrílico), ácidos poli-amino ou derivados destes, embora essa relação não pretenda ser restritiva. Os polissacarídeos referidos nesta exposição incluem pululano, dextrano, frutano e galactano.

15 Os segmentos hidrofóbicos, por outro lado, podem ser aminoácidos ácidos, e especialmente poli(ácido aspártico) e/ou seus derivados ou poli(ácido glutâmico) e/ou seus derivados. Exemplos específicos porém não exclusivos incluem derivados de poli(aminoácido ácido) como segmentos poli(β -benzil aspartato), poli(β -benzil aspartato-co-ácido aspártico), poli(β -alquil aspartato), poli(β -alquil aspartato-co-ácido aspártico), poli(β -alil aspartato), poli(β -alil aspartato-co-ácido aspártico), poli(β -aralquil aspartato), poli(β -aralquil aspartato-co-ácido aspártico), poli(γ -benzil glutamato), poli(γ -benzil glutamato-co-ácido glutâmico), poli(γ -alquil glutamato), poli(γ -alquil glutamato-co-ácido glutâmico), poli(γ -aralquil glutamato), poli(γ -aralquil glutamato-co-ácido glutâmico), poli(β -alquil aspartamida-co-ácido aspártico) e poli(γ -aralquil-glutamida-co-ácido glutâmico).

Os segmentos hidrofóbicos são hidrofóbicos em decorrência de cadeias laterais hidrofóbicas. A título de exemplos destas cadeias laterais hidrofóbicas podem ser mencionados benzila, fenila, alquila, C₄-C₁₆ alquila quer não-substituído ou substituído com um grupo amino ou grupo carboxila e -(CH₂)₄-fenila, bem como quaisquer combinações desejadas destes. Conforme explicado acima, uma vez que a taxa de liberação do fármaco encap-

5 sulado é ajustada pela estrutura de cadeias laterais hidrofóbicas introduzidas nos segmentos poli(derivados de aminoácido), as cadeias laterais hidrofóbicas são, de preferência, fenila ou benzila quando uma taxa de liberação rápida é desejada, e as cadeias laterais hidrofóbicas são, de preferência, alquila, como grupos C₄-C₁₆ alquila, quando uma taxa mais lenta de liberação é desejada.

Estes segmentos poli(derivados de aminoácido) podem ser formas modificadas conhecidas de polietilenoglicol-co-poliéster benzílico de ácido aspártico ou polietilenoglicol-co-poliéster benzílico de ácido glutâmico. Polietilenoglicol-co-poliéster benzílico de ácido aspártico ou polietilenoglicol-co-poliéster benzílico de ácido glutâmico podem ser preparados utilizando polietilenoglicol com uma extremidade protegida e um grupo amino na outra extremidade, por exemplo, MeO-PEG-CH₂CH₂CH₂-NH₂, como o material inicial, e adicionando N-carbóxi-β-benzil-L-aspartato (BLA-NCA) ou N-carbóxi-γ-benzil-L-glutamato (BLG-NCA) até o grau desejado de polimerização (número de unidades de aminoácidos) em solvente desidratado para reação.

Após acetilação das extremidades do copolímero em bloco obtido com cloreto de acetila ou anidrido acético, os grupos benzila são removidos por hidrólise alcalina para formar polietilenoglicol-co-poliácido aspártico ou polietilenoglicol-co-poliácido glutâmico e, em seguida, álcool benzílico é adicionado até a razão desejada de esterificação em solvente orgânico, sendo a reação conduzida na presença de um agente de condensação como N-N'-dicio-hexilcarbodi-imida (DCC) ou N-N'-di-isopropilcarbodi-imida (DIPCI), para ser obtido um copolímero em bloco com porções de éster benzílico.

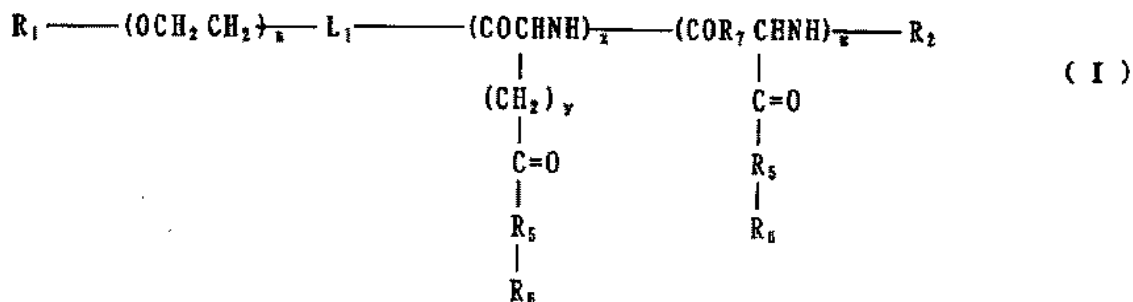
A reação com 1-octanol, por exemplo, em vez de com álcool benzílico produzirá polietilenoglicol-co-poliéster octílico de ácido aspártico e polietilenoglicol-co-poliéster octílico de ácido glutâmico, enquanto o uso de 1-dodecanol produzirá, da mesma forma, polietilenoglicol-co-poliéster dodecílico de ácido aspártico e 1-hexadecanol produzirá polietilenoglicol-co-poliéster hexadecílico de ácido aspártico.

Quando as cadeias laterais hidrofóbicas forem introduzidas por

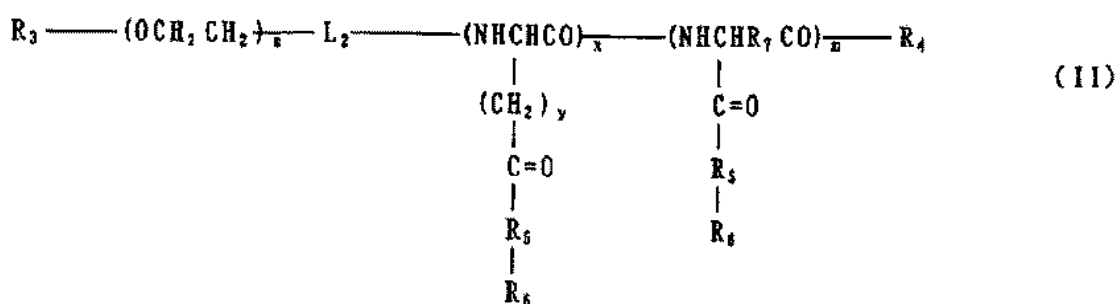
ligações amida, uma cadeia lateral hidrofóbica com grupo amino pode ser reagida com o grupo carboxila do polietilenoglicol-co-poliéster benzílico de ácido aspártico ou polietilenoglicol-co-poliéster benzílico de ácido glutâmico que foi acetilado conforme descrito acima e, em seguida, o grupo benzila
 5 removido por hidrólise alcalina, ou polietilenoglicol-co-poliéster benzílico de ácido aspártico pode ser reagido com um composto com uma amina primária, utilizando-se aminólise para conversão da ligação éster em ligação amida.

Alternativamente, 1-octilamina ou similar pode ser inicialmente
 10 adicionado ao polietilenoglicol-co-poliéster benzílico de ácido aspártico em solvente orgânico até a taxa desejada de amidação e a reação conduzida por um período prescrito de tempo e, em seguida, 1,8-diaminooctano ou similar adicionado em excesso ao éster benzílico não convertido, para serem obtidos segmentos poli(derivado de aminoácido) com uma combinação de
 15 cadeias laterais hidrofóbicas com as extremidades do grupo hidrofóbico substituídas com grupos amino e cadeias laterais hidrofóbicas sem substituição do grupo amino. A taxa de esterificação ou de amidação é de 40%-100% em relação ao número total de unidades de aminoácidos. Ácido aspártico e ácido glutâmico podem estar em formas opcionalmente ativas ou misturas destes. Os segmentos hidrofílicos e segmentos hidrofóbicos podem ser
 20 unidos por grupos de ligação conhecidos, como ligações éster, ligações amida, grupos imino, ligações carbono-carbono ou ligações éter.

Copolímeros em bloco que são facilmente produzidos e que podem ser convenientemente utilizados para a invenção incluem aqueles re-
 25 presentados pelas seguintes fórmulas (I) e (II).



ou



Nas fórmulas, R_1 e R_3 representam, cada um independentemente, hidrogênio ou um grupo alquila menor, quer não-substituído ou substituído com um grupo funcional opcionalmente protegido, R_2 representa hidrogênio, um grupo carbonila alifático C_1-C_{29} saturado ou não-saturado ou um grupo arilcarbonila, R_4 representa hidroxila, um grupo C_1-C_{30} óxi alifático ou aril-alquilóxi menor saturado ou não-saturado, R_5 representa $-O-$ ou $-NH-$, R_6 representa hidrogênio, fenila, $-(CH_2)_4$ -fenila, C_4-C_{16} alquila quer não-substituído ou substituído com um grupo amino ou grupo carboxila, ou benzila, R_7 representa metileno, n representa um número inteiro de 10 a 2500, x representa um número inteiro de 10 a 300, m representa um número inteiro de 0 a 300, com a ressalva que se m estiver presente, as unidades de $(CO-CHNH)$ e de (COR_7CHNH) serão aleatórias, R_6 pode ser selecionado para cada unidade de aminoácido em um copolímero em bloco e está presente aleatoriamente, porém hidrogênio como R_6 constitui menos do que 60% do R_6 total, y representa o número inteiro 1 ou 2, L_1 representa um grupo de ligação selecionado do grupo constituído por $-NH-$, $-O-$, $-O-Z-NH-$, $-CO-$, $-CH_2-$, $-O-Z-S-Z-$ e $-OCO-Z-NH-$, onde cada Z representa independentemente um grupo C_1-C_6 alquileno e L_2 representa um grupo de ligação selecionado do grupo constituído por $-OCO-Z-CO-$ e $-NHCO-Z-CO-$, onde Z é um grupo C_1-C_6 alquileno.

Como grupos funcionais opcionalmente protegidos podem ser mencionados hidroxila, acetal, cetal, aldeído, resíduos de açúcar, maleimida, carboxila, amino, tiol e grupos ativos éster. Segmentos hidrofílicos, em que R_1 e R_3 representam grupos alquila menores substituídos com grupos funcionais opcionalmente protegidos, podem ser obtidos pelos métodos descritos em WO96/33233, WO96/32434 e WO97/06202, por exemplo. Um grupo

alquila menor é um grupo C7 ou menor, de preferência, C4 ou grupo alquila menor de cadeia reta ou ramificada, cujos exemplos incluem metila, etila, propila, isopropila, butila e isobutila.

As micelas poliméricas podem ser formadas, por exemplo, por
5 dissolução do copolímero em bloco e da proteína ou do polipeptídeo fisiolo-
gicamente ativo em solução tampão adequada e agitação da mistura, con-
forme explicado acima. A formação da micela vazia é conduzida, de prefe-
rência, com aplicação de energia, por exemplo, por sonicação. Quando soni-
cação é utilizada, a formação pode ser obtida com Biodisruptor (Nippon Seiki
10 Co., Ltd.), por exemplo, em Nível 4, ao mesmo tempo em que resfriando em
gelo. O tempo de exposição não é especialmente restrito, desde que a prote-
ína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo não seja desnaturado, e pode
ser em intervalos de 1 segundo durante 5 segundos-10 minutos e, de prefe-
rência, de 5 segundos-2 minutos. Como um método diferente, o copolímero
15 em bloco secado pode ser tratado para se transformar em pó homogêneo ou
similar e a proteína ou polipeptídeo fisiologicamente ativo em forma em pó,
ou a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo dissolvido em quanti-
dade pequena de solução pode ser adicionado e misturado suavemente ao
mesmo por entre 2 e 24 horas a 4°C antes de tratamento ultrassônico ao
20 mesmo tempo em que resfriado em gelo.

Ainda como um outro método, uma solução tampão adequada
pode ser adicionada ao copolímero em bloco e a mistura submetida a trata-
mento ultrassônico para o preparo de micelas vazias, conforme mencionado
acima, e, em seguida, a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo
25 dissolvido na mesma solução tampão ou a proteína ou o polipeptídeo fisiolo-
gicamente ativo diluído na solução tampão pode ser adicionado à mesma, e
a mistura agitada com agitador ou colocada suavemente. O tempo para agi-
tação ou colocação é, de preferência, entre 2 horas e 5 dias, e a temperatu-
ra, de preferência, de 4°C a 30°C, sendo o mais preferível de 4°C. Este mé-
30 todo é vantajoso do ponto de vista de estabilidade da proteína ou do polipep-
tídeo fisiologicamente ativo, uma vez que a proteína ou o polipeptídeo fisio-
logicamente ativo não é submetido a tratamento ultrassônico. Em qualquer

caso, a solução tampão adequada é, de preferência, aquela que satisfaça a relação supramencionada entre pI e pH .

Não há restrições especiais quanto ao tamanho de partículas das micelas poliméricas para encapsulamento da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo, preparadas nesta maneira, desde que este permita administração *in vivo*, porém, de preferência, o tamanho não é maior do que 10 μm , sendo mais preferível que não seja maior do que 5 μm . Especialmente para uso em administração intravenosa, o tamanho, de preferência, não é maior do que 500 nm, sendo mais preferível que não seja maior do que 300 nm. Se necessário, uma solução contendo a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo encapsulado em micelas poliméricas pode ser filtrada em filtro hidrofílico com tamanho desejado de poro.

Quando a proteína ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo encapsulado em micelas poliméricas da invenção forem administradas *in vivo*, a via de administração pode ser qualquer uma desejada como, por exemplo, administração intravenosa, administração subcutânea, administração intramuscular, administração intra-articular, administração intraperitoneal ou administração intraocular. Em um modo preferido da invenção, o método de produção pode incluir uma etapa na qual vários sacarídeos e/ou vários polietilenoglicóis (por exemplo, Macrogol) são adicionados às micelas poliméricas para encapsulamento do fármaco (ou à solução aquosa) antes que a filtração estéril. Sacarídeos que podem ser utilizados incluem maltose, trehalose, xilitol, glicose, sacarose, frutose, lactose, manitol, dextrina e similares, e polietilenoglicóis que podem ser utilizados incluem aqueles com pesos moleculares de aproximadamente 1000 a aproximadamente 35.000, como Macrogol 1000, 1540, 4000, 6000, 20.000 e 35.000, embora estes exemplos não sejam limitações.

Uma fórmula de micela polimérica para encapsulamento de proteína ou polipeptídeo fisiologicamente ativo da invenção pode ser liofilizada desde que o mesmo não afete a estabilidade da proteína ou do polipeptídeo fisiologicamente ativo encapsulado. Quando liofilizada, a fórmula seca pode ser novamente dissolvida ou reconstituída em uma solução contendo miche-

las poliméricas que encapsulam proteína ou polipeptídeo fisiologicamente ativo, empregando água ou uma solução aquosa.

5 Para liofilização, um sacarídeo pode ser adicionado à solução antes que a liofilização até uma concentração final de 0,1-15% (p/v), ou poli-
 etilenoglicol pode ser adicionado até uma concentração final de 0,5-10%
 (p/v). A proporção entre o copolímero em bloco e o sacarídeo ou polietileno-
 glicol será normalmente de 1:1-1:10 ou de 1:0,5-1:10 por peso.

10 De acordo com um modo preferido, as extremidades dos seg-
 mentos hidrofílicos podem possuir grupos funcionais capazes de se ligarem
 a uma molécula pretendida como alvo. Como grupos funcionais capazes de
 se ligarem a moléculas pretendidas como alvo, podem ser mencionados
 grupos hidroxila, acetal, cetal, aldeído, carboxila, maleimida, amino, tiol e
 grupos ativos éster, sem quaisquer restrições em especial, e estes grupos
 funcionais podem ser também protegidos. Como moléculas pretendidas co-
 15 mo alvo, podem ser mencionados ligantes, anticorpos ou seus fragmentos
 funcionais, proteínas, peptídeos e similares, sem quaisquer restrições em
 especial. Quando for ligada a um grupo funcional, a ligação com a molécula
 pretendida como alvo pode ser por qualquer método apropriadamente sele-
 cionado de acordo com a estrutura da molécula.

20 Exemplos e exemplos comparativos serão a seguir apresenta-
 dos para uma descrição mais detalhada da invenção.

Na descrição seguinte, por exemplo, um copolímero em bloco de
 PEG com peso molecular médio de 12.000, unidade de ácido poliamino em
 média de 40 resíduos e razão de introdução de éster benzílico de aproxima-
 25 damente 65% é indicado por 12-40(65) após o nome do copolímero em blo-
 co, enquanto que o mesmo com éster octílico ou outra razão de introdução
 de aproximadamente 65% é indicado por 12-40(65). O termo "aproximada-
 mente 65%" significa aproximadamente 62%-68%.

Exemplos

30 1) Medição de eficiência de encapsulamento

Exemplo 1 (Preparo 1 de micelas para encapsulamento de IgG humana)

O copolímero em bloco utilizado foi polietilenoglicol-co-poliéster

benzílico de ácido aspártico (a seguir denominado PEG-PBLA. Neste polímero, os resíduos de ácido aspártico sem éster benzílico pertencem à fórmula geral (I), em que R₅ é -O- e R₆ é hidrogênio (o mesmo abaixo nesta exposição)). Além disso, todos os copolímeros em bloco seguintes pertencem à fórmula geral (I) em que R₁ é CH₃, L₁ é -O(CH₂)₃NH e R₂ é COCH₃.

5 Após pesar precisamente 10 mg de PEG-PBLA 12-50(65) em um frasco de vidro, 1 ml de diclorometano foi adicionado para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio, sendo em seguida secada ainda mais por aproximadamente 1 hora sob

10 pressão negativa. A esta foram adicionados 62 µl de uma solução tampão fosfato a 20 mM (pH 6, 16,5 mg/ml) contendo IgG humana purificada (MP Biomedicals Co.) (pI: aproximadamente 8) e, em seguida, 1,938 ml de tampão fosfato a 20 mM (pH 6) ou tampão TAPS a 20 mM TAPS (pH 8) foram lentamente adicionados sob agitação suave a 4°C. Após agitação durante a

15 noite a 4°C, foi utilizado um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) para sonicação por aproximadamente 10 segundos (em intervalos de 1 segundo, rendimento: Baixo) enquanto resfriada em gelo, e a mistura foi submetida à filtração em gel (Sephacrose[®] CL-4B, Sigma-Aldrich Corp., ~2φ × 30 cm). A concentração de IgG de cada fração recuperada (e-

20 luate: tampão fosfato a 20 mM (pH 7,4), vazão: 1,0 ml/min, volume de fração: 1 ml) foi analisada utilizando um Ensaio BCA para Proteína (Pierce Corp.). A eficiência do encapsulamento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{(\text{Teor protéico em fração de micela}) \times 100}{\text{Teor protéico total em todas as frações}}$$

A eficiência do encapsulamento foi de 94% com o preparo em

25 pH 6, tendo sido de 41% com o preparo em pH 8. Os resultados indicam que a proteína foi encapsulada mais eficientemente pelo preparo das micelas sob condições em que o pH era diferente do ponto isoelétrico da proteína encapsulada, do que quando foram preparadas próximo ao ponto isoelétrico, com base em interação eletrostática entre a proteína e PEG-PBLA 12-

30 50(65).

Exemplo 2 (Preparo 2 de micelas para encapsulamento de IgG humana)

O copolímero em bloco utilizado foi polietilenoglicol-co-poliéster benzílico de ácido glutâmico (a seguir denominado PEG-PBLG. Neste polímero, os resíduos de ácido glutâmico sem éster benzílico pertencem à fórmula geral (I), em que R_5 é -O- e R_6 é hidrogênio (o mesmo abaixo nesta exposição)). Após pesar precisamente 10 mg de PEG-PBLG 12-40(65) em um frasco de vidro, 1 ml de diclorometano foi adicionado para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio, sendo em seguida secada ainda mais por aproximadamente 1 hora sob pressão negativa. A esta foram adicionados 62 μ l de uma solução tampão fosfato (pH 6, 16,5 mg/ml) contendo IgG humana purificada (MP Biomedicals Co.) (pI: aproximadamente 8) e, em seguida, 1,938 ml de tampão fosfato a 20 mM (pH 6) ou tampão TAPS a 20 mM (pH 8) foram adicionados lentamente sob agitação suave a 4°C. Após agitação durante a noite a 4°C, um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) foi utilizado para sonicação por aproximadamente dez segundos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo), sendo a mistura submetida à filtração em gel (Sephacrose® CL-4B, Sigma-Aldrich Corp., $\sim 2\phi \times 30$ cm). A concentração de IgG de cada fração recuperada (eluente: tampão fosfato a 20 mM (pH 7,4), vazão: 1,0 ml/min, volume de fração: 1 ml) foi analisada com um Ensaio BCA para Proteína (Pierce Corp.). A eficiência do encapsulamento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{(\text{Teor protéico em fração de micela}) \times 100}{\text{Teor protéico total em todas as frações}}$$

A eficiência do encapsulamento foi de 83% com preparo em pH 6, tendo sido de 63% com preparo em pH 8. Os resultados indicam que a proteína foi encapsulada mais eficientemente pelo preparo das micelas sob condições em que o pH era diferente do ponto isoelétrico da proteína encapsulada, do que quando foram preparadas próximo ao ponto isoelétrico, com base em interação eletrostática entre a proteína e PEG-PBLG 12-40(65).

Exemplo 3 (Preparo 3 de micelas para encapsulamento de IgG humana)

O copolímero em bloco utilizado foi polietilenoglicol-co-poliéster octílico de ácido aspártico (a seguir denominado PEG-POLA. Neste polímero, os resíduos de ácido aspártico sem éster octílico pertencem à fórmula geral (I), em que R₅ é -O- e R₆ é hidrogênio (o mesmo abaixo nesta exposição)). Após pesar precisamente 10 mg de PEG-POLA 12-40(65) em um frasco de vidro, 1 ml de diclorometano foi adicionado para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio e, em seguida, secada ainda mais por aproximadamente 1 hora sob pressão negativa. A esta foram adicionados 62 µl de uma solução de tampão fosfato a 20 mM (pH 6, 16,5 mg/ml) contendo IgG humana purificada (MP Biomedicals Co.) (pI: aproximadamente 8) e, em seguida, 1,938 ml de tampão fosfato a 20 mM (pH 6) ou tampão TAPs a 20 mM (pH 8) foram adicionados lentamente sob agitação suave a 4°C. Após agitação durante a noite a 4°C, um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) foi utilizado para sonicação por aproximadamente 10 segundos (intervalo de 1 segundo, Baixo) enquanto resfriada em gelo, sendo a mistura submetida à filtração em gel (Sepharose[®] CL-4B, Sigma-Aldrich Corp., -2φ × 30 cm). A concentração de IgG de cada fração recuperada (eluente: tampão fosfato a 20 mM (pH 7,4), vazão: 1,0 ml/min, volume de fração: 1 ml) foi avaliada por análise de aminoácidos (AccQ-Tag[™], Waters Co.). A eficiência do encapsulamento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{(\text{Teor protéico em fração de micela}) \times 100}{\text{Teor protéico total em todas as frações}}$$

A eficiência do encapsulamento foi de 97% com preparo em pH 6, tendo sido de 24% com preparo em pH 8. Os resultados indicam que a proteína foi encapsulada mais eficientemente pelo preparo das micelas sob condições em que o pH era diferente do ponto isoelétrico da proteína encapsulada, do que quando foram preparadas próximo ao ponto isoelétrico, com base em interação eletrostática entre a proteína e PEG-POLA 12-40(65). Exemplo Comparativo 1 (Preparo 4 de micelas para encapsulamento de IgG humana)

Após pesar precisamente 10 mg de PEG-PBLA 12-50(100) em um frasco de vidro, 1 ml de diclorometano foi adicionado para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio e, em seguida, secada ainda mais por aproximadamente 1 hora sob
5 pressão negativa. A esta foram adicionados 62 µl de uma solução de tampão fosfato a 20 mM (pH 6, 16,5 mg/ml) contendo IgG humana purificada (MP Biomedicals Co.) (pI: aproximadamente 8) e, em seguida, 1,938 ml de tampão fosfato a 20 mM (pH 6) ou tampão TAPS a 20 mM (pH 8) foram adicionados lentamente sob agitação suave a 4°C. Após agitação durante a
10 noite a 4°C, um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) foi utilizado para sonicação por aproximadamente dez segundos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo) enquanto resfriada em gelo, sendo a mistura submetida à filtração em gel (Sephacrose® CL-4B, Sigma-Aldrich Corp., -2φ × 30 cm). A concentração de IgG de cada fração recuperada (e-
15 luente: tampão fosfato a 20 mM (pH 7,4), vazão: 1,0 ml/min, volume de fração: 1 ml) foi analisada com um Ensaio BCA para Proteína (Pierce Corp.). A eficiência do encapsulamento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{(\text{Teor protéico em fração de micela}) \times 100}{\text{Teor protéico total em todas as frações}}$$

A eficiência do encapsulamento foi de 22% com preparo em pH
20 6, tendo sido de 65% com preparo em pH 8. Os resultados indicam que utilizando PEG-PBLA 12-50(100) que não possui grupos carboxila, não houve participação da interação eletrostática, mesmo quando as micelas foram preparadas sob condições em que o pH era diferente do ponto isoelétrico da proteína encapsulada, tendo sido, por conseguinte, difícil obter um encapsu-
25 lamento eficiente da proteína. A proteína foi encapsulada com base na interação hidrofóbica quando o preparo foi próximo do ponto isoelétrico.

Exemplo Comparativo 2 (Preparo de micelas para encapsulamento de IgG com FITC marcado)

Três copolímeros em bloco foram utilizados, um copolímero em
30 bloco composto por polietilenoglicol-poliácido aspártico (número médio de

resíduos: aproximadamente 50, não-esterificados), PEG-PBLA 12-50(65) e PEG-POLA 12-40(65). Após pesar precisamente 20 mg de cada polímero em um frasco de vidro, 2 ml de diclorometano foram adicionados para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio e, em seguida, secada ainda mais por aproximadamente 1 hora sob pressão negativa. A esta foram adicionados 100 µl de uma solução tampão fosfato contendo imunoglobulina humana com FITC marcado (FITC-IgG) (Sigma-Aldrich Corp., 20 mg/ml) e, em seguida, 1,9 ml de tampão fosfato a 20 mM (pH 6) foram adicionados lentamente enquanto sob agitação suave a 4°C. Após agitação adicional durante a noite a 4°C, um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) foi utilizado para sonicação por aproximadamente 10 segundos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo) enquanto resfriada em gelo, sendo a mistura submetida à ultracentrifugação (30.000 rpm, 1 hora, 4°C, Rotor MLA-130 da Beckman Coulter). A fração de micelas recuperada com precipitação foi suspensa em tampão fosfato a 20 mM (pH 6) e submetida, em seguida, à filtração em gel (Sephacose® CL-4B, Sigma-Aldrich Corp., -2φ × 30 cm). A concentração de FITC-IgG em cada fração recuperada (eluente: tampão fosfato a 20 mM (pH 7,4), vazão: 1,0 ml/min, volume de fração: 1 ml) foi analisada utilizando um leitor de placa (PowerScan® HT, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) (cumprimento de onda de excitação: 485 nm ± 20 nm, comprimento de onda de emissão: 528 nm ± 20 nm) e a eficiência do encapsulamento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{(\text{Teor protéico em fração de micela}) \times 100}{\text{Teor protéico total em todas as frações}}$$

A eficiência do encapsulamento foi de 6% quando um copolímero em bloco composto por polietilenoglicol-poliácido aspártico (número médio de resíduos: 50, não-esterificados) foi utilizado. Quando PEG-PBLA 12-50(65) e PEG-POLA 12-40(65) foram utilizados, a eficiência do encapsulamento foi de 51% e 60%, respectivamente. Os resultados indicam que a proteína pode ser encapsulada mais eficientemente pelo uso de um polímero

compreendendo, no geral, segmentos hidrofóbicos com substituintes hidrofóbicos e grupos com carga elétrica, sugerindo que a interação hidrofóbica é responsável também pelo encapsulamento, em acréscimo à interação eletrostática. Estes resultados quando considerados à luz dos resultados dos Exemplos 1-3 indicam que a estrutura dos grupos hidrofóbicos nos segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco não desempenha um papel importante na eficiência do encapsulamento.

Exemplo 4 (Preparo de micelas para encapsulamento de albumina sérica bovina com FITC marcado)

Após pesar precisamente 40 mg de PEG-PBLA 12-50(65) em um frasco de vidro, 2 ml de diclorometano foram adicionados para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio, sendo secada ainda por aproximadamente 1 hora sob pressão negativa. A esta foram adicionados 200 µl de uma solução aquosa (20 mg/ml) de albumina sérica bovina com FITC marcado (Sigma-Aldrich Corp.) (pl: aproximadamente 5) e, em seguida, 3,8 ml de tampão citrato a 50 mM (pH 3,5) ou tampão fosfato a 20 mM (pH 6) foram adicionados gradualmente enquanto sob agitação suave a 4°C. Após agitação adicional durante a noite a 4°C, um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) foi utilizado para sonicação por aproximadamente 10 segundos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo) enquanto resfriada em gelo, tendo sido a mistura submetida à ultracentrifugação (30.000 rpm, 1 hora, 4°C, Rotor MLA-130 da Beckman Coulter). A concentração de albumina sérica bovina com FITC marcado no sobrenadante foi analisada empregando um leitor de placa (PowerScan® HT, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) (comprimento de onda de excitação: 485 nm ± 20 nm, comprimento de onda de emissão: 528 nm ± 20 nm), e a eficiência do encapsulamento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{(\text{Teor protéico antes da ultracentrifugação} - \text{teor protéico do sobrenadante}) \times 100}{\text{Teor protéico antes da ultracentrifugação}}$$

A eficiência do encapsulamento foi de 16% com preparo em pH

3,5, tendo sido de 7% com preparo em at pH 6. Os resultados indicam que a proteína foi encapsulada mais eficientemente pelo preparo das micelas sob condições em que o pH era diferente do ponto isoelétrico da proteína encapsulada, do que quando preparadas próximo ao ponto isoelétrico, com base em interação eletrostática entre a proteína e PEG-PBLA 12-50(65).

Exemplo 5 (Preparo de micelas para encapsulamento de hemoglobina bovina)

Após pesar precisamente 20 mg de PEG-PBLA 12-50(65) em um frasco de vidro, 2 ml de diclorometano foram adicionados para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio e, em seguida, secada ainda por aproximadamente 1 hora sob pressão negativa. A esta foram adicionados 100 µl de uma solução aquosa (20 mg/ml) de hemoglobina bovina (Sigma-Aldrich Corp.) (pt: aproximadamente 7) e, em seguida, 1,9 ml de tampão fosfato a 20 mM (pH 6,0) ou tampão fosfato a 20 mM (pH 7,4) foram adicionados gradualmente enquanto sob agitação suave a 4°C. Após agitação durante a noite a 4°C, um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) foi utilizado para sonicação por aproximadamente 10 segundos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo) enquanto resfriada em gelo, e a mistura foi submetida à filtração em gel (Sephacose® CL-4B, Sigma-Aldrich Corp., -2φ × 30 cm). A concentração de hemoglobina em cada fração recuperada (eluente: tampão fosfato a 20 mM (pH 7,4), vazão: 1,0 ml/min, volume de fração: 1 ml) foi analisada utilizando um leitor de placa (PowerScan® HT, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.). A eficiência do encapsulamento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{(\text{Teor protéico em fração de micela}) \times 100}{\text{Teor protéico total em todas as frações}}$$

A eficiência do encapsulamento foi de 19% com preparo em pH 6,0, tendo sido de 10% com preparo em pH 7,4. Os resultados indicam que a proteína foi encapsulada mais eficientemente pelo preparo das micelas sob condições mais ácidas do que o ponto isoelétrico da proteína encapsulada,

do que quando preparadas sob condições mais alcalinas do que o ponto isoelétrico, com base em interação eletrostática entre a proteína e PEG-PBLA 12-50(65).

5 Exemplo 6 (Preparo micelas para encapsulamento de interferon- α humano recombinante)

Por um lado, após pesar precisamente 7,0 mg de PEG-PBLA 12-50(65) em um frasco de vidro, 0,7 ml de diclorometano foram adicionados para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio e foi secada ainda por aproximadamente 1 hora sob pressão negativa. A esta foi adicionada uma solução de PBS com interferon- α humano recombinante (pl: aproximadamente 6,0) (IFN- α , PBL Biomedical Laboratories) (0,2 mg/ml, 35 μ l) e, em seguida, 200 μ l de tampão MES a 0,1 M MES (pH 5,0) foram adicionados. A mistura foi misturada suavemente a 4°C até essencialmente dissolução total do polímero e, em seguida, tampão MES a 20 mM (pH 5,0) foi adicionado até um volume total de 1,4 ml e a agitação prosseguiu durante a noite a 4°C. Quando concluída a agitação, a mistura foi submetida a ultracentrifugação (30.000 rpm, 1 hora, 4°C, Rotor MLA-130 da Beckman Coulter) e a concentração de IFN- α do sobrenadante foi avaliada empregando um kit de ELISA (PBL Biomedical Laboratories).

Por outro lado, após pesar precisamente 2,6 mg de PEG-PBLA 12-50(65) em um frasco de vidro, 0,26 ml de diclorometano foram adicionados para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio e foi secada ainda por aproximadamente 1 hora sob pressão negativa. A esta, foi adicionada uma solução de PBS com interferon- α humano recombinante (0,2 mg/ml, 12,5 μ l) igual à de antes e, em seguida, 100 μ l tampão TAPS a 0,1 M (pH 8,0) foram adicionados. A mistura foi misturada suavemente a 4°C até essencialmente dissolução total do polímero e, em seguida, 400 μ l de tampão TAPS a 20 mM (pH 8,0) foram adicionados e a agitação prosseguiu durante a noite a 4°C. Quando concluída a agitação, a mistura foi submetida a ultracentrifugação (30.000 rpm, 1 hora, 4°C, Rotor MLA-130 da Beckman Coulter) e a concentração de IFN- α

do sobrenadante foi avaliada empregando um kit de ELISA (PBL Biomedical Laboratories). A eficiência do encapsulamento foi calculada pela fórmula abaixo com base nos valores medidos obtidos de cada teste.

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{(\text{Teor protéico no preparo} - \text{teor protéico do sobrenadante}) \times 100}{\text{Teor protéico no preparo}}$$

A eficiência do encapsulamento foi de 100% com preparo em pH 5,0, tendo sido de 36% com preparo em pH 8,0. Os resultados indicam que a proteína foi encapsulada mais eficientemente pelo preparo das micelas sob condições mais ácidas do que o ponto isoelétrico da proteína encapsulada, do que quando preparadas sob condições mais alcalinas do que o ponto isoelétrico, com base em interação eletrostática entre a proteína e PEG-PBLA 12-50(65).

Exemplo 7 (Preparo de micelas para encapsulamento de papaína)

- 5 Após pesar precisamente 20 mg de PEG-PBLA 12-40(65) em um frasco de vidro, 2 ml de diclorometano foram adicionados para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio e, em seguida, secada ainda por aproximadamente 1 hora sob pressão negativa. A esta foram adicionados 100 µl de uma solução aquosa de papaína (Sigma-Aldrich Corp.) (pI: aproximadamente 8) (20 mg/ml)
- 10 e, em seguida, 1,9 ml de tampão fosfato a 20 mM (pH 6,0) ou tampão TAPS a 20 mM (pH 8,0) foram adicionados gradualmente sob agitação suave a 4°C. Após agitação durante a noite a 4°C, um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) foi utilizado para sonicação por aproximadamente 10 segundos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo) enquanto resfriada em gelo, e a mistura foi submetida à filtração em gel (Sephacel® CL-4B, Sigma-Aldrich Corp., ~2φ × 30 cm). A concentração de papaína em cada fração recuperada (eluente: tampão fosfato a 20 mM (pH 7,4), vazão: 1,0 ml/min, fração de volume: 1 ml) foi analisada com um Ensaio
- 20 BCA para proteína (Pierce Corp.) A eficiência do encapsulamento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{(\text{Teor protéico em fração de micela}) \times 100}{\text{Teor protéico total em todas as frações}}$$

A eficiência do encapsulamento foi de 27% com preparo em pH 6,0, sendo de 9% com preparo em pH 8,0. Os resultados indicam que a proteína pode ser encapsulada mais eficientemente pelo preparo de micelas sob condições em que o pH é diferente do ponto isoelétrico da proteína encapsulada, do que quando preparadas próximo do ponto isoelétrico, com base em interação eletrostática entre a proteína e PEG-PBLA 12-40(65).

Além disso, os resultados dos exemplos descritos acima demonstram que uma ampla gama de proteínas pode ser encapsulada eficientemente em micelas poliméricas de acordo com a invenção.

2) Avaliação de taxa de liberação de proteína de micelas

Exemplo 8 (Avaliação de liberação de IgG humana com FITC marcado encapsulado em micelas)

O copolímero em bloco utilizado foi PEG-PBLA 12-50(65) ou PEG-POLA 12-40(50). Após pesar precisamente 20 mg de cada polímero em um frasco, 2 ml de diclorometano foram adicionados para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio e, em seguida, secada ainda por aproximadamente 1 hora sob pressão negativa. A esta foram adicionados 100 µl de imunoglobulina humana com FITC marcado (FITC-IgG) (Sigma-Aldrich Corp., 20 mg/ml) e, em seguida, 3,9 ml de tampão fosfato a 20 mM (pH 6,0) foram adicionados lentamente sob agitação suave. Após agitação adicional durante a noite a 4°C, um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) foi utilizado para sonicação por aproximadamente 10 segundos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo) enquanto resfriada em gelo, e a mistura foi submetida à ultracentrifugação (30.000 rpm, 4°C, 1 hora) para serem obtidas micelas. As micelas recuperadas foram suspensas em tampão fosfato a 20 mM (pH 6), adicionadas a soro bovino [concentração final do soro bovino: 50% (v/v)] e, em seguida, incubadas a 37°C. A fim de avaliar a liberação do FITC-IgG encapsulado, 1 ml de amostra foi submetido à filtração em gel (Sephacrose® CL-4B, Sigma-Aldrich Corp., -2φ × 30 cm) após um tempo de

incubação predeterminado. A concentração de FITC-IgG em cada fração recuperada (eluente: tampão fosfato a 20 mM (pH 7,4), vazão: 1,0 ml/min, volume de fração: 1 ml) foi analisada empregando um leitor de placas (PowerScan® HT, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) (comprimento de onda de excitação: 485 nm ± 20 nm, comprimento de onda de emissão: 528 nm ± 20 nm) e a taxa de liberação, calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{\text{Teor protéico da fração de IgG humana com FITC marcado} \times 100}{\text{Teor protéico de fração micelar recuperada por filtração em gel aplicada imediatamente após mistura com solução tampão}}$$

(A solução tampão foi tampão fosfato as 20 mM (pH 6).)

O ciclo de tempo da liberação é apresentado na Figura 1. Estes resultados indicam que a proteína encapsulada nas micelas exibiu liberação prolongada sem liberação inicial, mesmo na presença de soro. Dessa forma, foi demonstrado que a taxa de liberação era dependente da estrutura dos grupos hidrofóbicos. Sem estar restrito a qualquer teoria em particular, acredita-se que um fármaco macromolecular é mantido mais firmemente nos núcleos de micelas se a estrutura dos grupos hidrofóbicos introduzidos nos segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco, formador das micelas, é uma estrutura linear de grupos alquila em vez de estrutura em plano, como a de benzila, de modo que a liberação ocorre de maneira mais controlada.

Exemplo 9 (Teste de administração intravenosa de interferon- α)

O copolímero em bloco utilizado foi PEG-PBLA 12-50(65) ou PEG-POLA 12-40(65). Após pesar precisamente 10 mg do polímero em um frasco, 1 ml de diclorometano foi adicionado para dissolução. A solução foi secada até transformar-se em filme sob uma corrente de gás nitrogênio e, em seguida, secada ainda por aproximadamente 3 horas sob pressão negativa. A esta foi adicionada uma solução PBS de interferon- α humano recombinante (IFN- α , PBL Biomedical Laboratories) (0,2 mg/ml, 46 μ l) e, em seguida, 200 μ l de tampão MES a 0,2 M (pH 5,0) foram adicionados. A mistura foi agitada suavemente a 4°C até essencialmente dissolução total do polímero e, em seguida, tampão MES a 20 mM (pH 5,0) foi adicionado até o volu-

me total de 2 ml e a agitação prosseguiu por todo um dia a 4°C. A amostra foi submetida à ultracentrifugação (30.000 rpm, 1 hora, 4°C, Rotor MLA-130 da Beckman Coulter) e o INF- α não-encapsulado foi removido ao mesmo tempo em que eram recuperadas as micelas precipitadas. As micelas foram suspensas em solução aquosa de glicose a 5% e fornecidas para o experimento seguinte com animais.

Ratos machos Wistar de seis semanas de vida foram divididos em grupos de 2 ratos cada, e solução em teste foi administrada através da veia do rabo em dose de 1×10^6 IU/kg. 5 minutos e 1, 3, 6, 9 e 24 horas após a administração, cerca de 0,2 ml de sangue foram coletados da veia cervical utilizando uma seringa revestida com heparina. O sangue foi centrifugado imediatamente em 13.800 rpm, 4°C (EF-1300, ECO-Fuge™, Tomy Seiko Co., Ltd.) e o plasma foi colhido e armazenado a -30°C até ser analisado. A concentração plasmática de interferon- α foi determinada por um kit ELISA para interferon- α humano (PBL Biomedical Laboratories).

Os resultados são apresentados na Figura 2. O encapsulamento de interferon- α em micelas poliméricas melhorou a retenção da concentração plasmática. Os parâmetros farmacocinéticos, calculados de acordo com um modelo não-compartimental, são apresentados abaixo.

Parâmetros farmacocinéticos	Solução de NaCl a 0,9%	Micelas de PEG-POLA 12-40(65)s	Micelas de PEG-PBLA 12-50(65)
AUC _{inf} (% dose/ml·h)	0,20	7,0	3,5
T _{1/2} (h)	0,11	10,4	1,3
Cl (ml/h/corpo)	491	14,4	28,9
MRT _{inf} (h)	0,2	3,2	0,4
V _{ss} (ml/corpo)	81	46	12

O encapsulamento em micelas aumentou a AUC em de 17 a 35 vezes. Esses resultados indicam que as micelas que encapsularam a proteína permaneceram na circulação sanguínea por tempo prolongado sem liberação inicial. Estes resultados mostram também que a taxa de liberação da proteína *in vivo* depende da estrutura do grupo hidrofóbico do copolímero em

bloco, de modo similar aos resultados *in vitro*.

Exemplo 10 (Teste de administração intravenosa a ratos com lisozima FITC marcada encapsulada em micelas)

1) Marcação de FITC da lisozima

5 Após dissolver 100 mg de lisozima (proveniente de clara de ovo) (Sigma-Aldrich Corp.) em 2 ml de tampão de ácido bórico a 100 mM (pH 8,5), 170 µl de solução de 50 mg/ml de DMSO contendo FITC (PIERCE) foram adicionados. Após agitação em temperatura ambiente por 1 hora, o FITC não reagido foi removido por filtração em gel (PD-10, produto da GE
10 Healthcare Bioscience) (eluente: tampão fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,4). Após diálise subsequente em água a 4°C, a mistura foi purificada por filtração adicional em gel (Sephacrose® CL-4B, Sigma-Aldrich Corp.) (eluente: tampão fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,4).

2) Preparo de micelas para encapsulamento de lisozima FITC marcada e
15 teste PK em ratos

 Após pesar precisamente 40 mg do copolímero em bloco PEG-POLA 12-40(65) em um frasco de vidro, 4 mg de lisozima FITC marcada (29,2 mg/ml, 137 µl) e, em seguida, 500 µl de tampão fosfato de sódio a 20 mM (pH 6,0) foram adicionados. Após agitação adicional durante a noite a
20 4°C, um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) foi utilizado para sonicação por aproximadamente 10 segundos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo) enquanto resfriada em gelo. A fração recuperada de micelas sob a forma de precipitado obtido por ultracentrifugação (80.000 rpm, 1 hora, 4°C, Rotor MLA-80 da Beckman Coulter) foi suspensa
25 em tampão fosfato de sódio a 20 mM (pH 7,4)/5% de glicose e, em seguida, lavada pelo mesmo procedimento de ultracentrifugação, ressuspendida na mesma solução tampão para o teste seguinte de administração a ratos.

 Ratos Wistar machos de seis semanas de vida foram divididos em grupos de 3 ratos cada, e a solução em teste foi administrada através da
30 veia do rabo em dose de 10 mg/kg de lisozima FITC marcada. 5 minutos e 1, 3, 6, 9 e 24 horas após a administração, cerca de 0,2 ml de sangue foram coletados da veia cervical utilizando uma seringa revestida com heparina. O

sangue foi centrifugado imediatamente a 4°C (EF-1300, ECO-Fuge™, Tomy Seiko Co., Ltd.) e o plasma foi colhido e armazenado a -30°C até ser analisado. Uma solução de lisozima FITC marcada (tampão fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,4/5% de glicose) foi testada também na mesma maneira. A concentração plasmática do sangue foi medida por HPLC, empregando as seguintes condições para o procedimento.

Sistema: Waters Alliance System

Coluna: Tosoh TSK-gel Super SW3000 (4,6 φ × 300 mm)(30°C)

Fase líquida: tampão fosfato de sódio a 20 mM (pH 7,4)

10 Vazão: 0,25 ml/min

Detecção: Fluorescência (Ex: 492 nm, Em: 520 nm)

Volume de injeção: 10 µl

Os resultados são apresentados na Figura 3. A AUC aumentou aproximadamente 15 vezes para encapsulamento em micelas, comparado à administração de somente a solução. Estes resultados indicam que a proteína encapsulada nas micelas permanece na circulação sanguínea por tempo prolongado sem liberação inicial.

Exemplo 11 (Teste 2 de administração intravenosa com interferon-α encapsulado em micelas)

20 O copolímero em bloco utilizado foi polietilenoglicol-co-poliéster dodecílico de ácido aspártico (a seguir denominado PEG-PDLA. Neste polímero, os resíduos de ácido aspártico sem ésteres dodecílico pertencem à fórmula geral (I), em que R₅ é -O- e R₆ é hidrogênio (o mesmo abaixo)), ou polietilenoglicol-co-poliéster hexadecílico de ácido aspártico (a seguir denominado PEG-PHLA. Os resíduos de ácido aspártico sem ésteres hexadecílico pertencem à mesma fórmula geral, em que R₅ é -O- e R₆ é hidrogênio (o mesmo abaixo nesta exposição)). Após pesar precisamente 200 mg de PEG-PDLA 12-40(65) ou de PEG-PHLA 12-40(65) em um frasco de vidro, 10 ml de tampão MES a 20 mM (pH 5,0) foram adicionados e a mistura agitada vigorosamente durante a noite a 4°C. A dispersão do polímero foi submetida a tratamento ultrassônico por aproximadamente 15 minutos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo), utilizando um Biodisruptor (Unidade de Alta

Potência, produto da Nissei Corp.) enquanto resfriada em gelo, para obtenção de uma solução de micelas vazias com concentração de polímero de 20 mg/ml. Uma alíquota de 0,65 ml da solução de micelas vazias foi transferida para um microtubo (Ieda Chemicals Co., Ltd.) e, em seguida, 65 µl de uma
5 solução PBS de interferon- α humano recombinante (IFN- α , PBL Biomedical Laboratories) e 50 µl de tampão MES a 0,1 M (pH 5,0) foram adicionados e a mistura coletada cuidadosamente com pipeta e deixada a seguir em repouso a 4°C por 4 dias. Em seguida, foi lavada com solução de glicose a 5%, utilizando uma unidade de ultrafiltração [AMICON® ULTRA-4 pela Milli-
10 pore (limite molecular: 100.000)] e concentrada para uso no experimento seguinte com animais.

Ratos Wistar machos de seis semanas de vida foram divididos em grupos de 3 ratos cada, e a solução em teste foi administrada através da veia do rabo em dose de 1×10^6 IU/kg. 5 minutos e 1, 3, 6, 9 e 24 horas após a administração, cerca de 0,2 ml de sangue foram coletados da veia
15 cervical utilizando uma seringa revestida com heparina. O sangue foi centrifugado imediatamente em 13.800 rpm, 4°C (EF-1300, ECO-Fuge™, Tomy Seiko Co., Ltd.) e o plasma foi colhido e armazenado a -30°C até ser analisado. A concentração plasmática de interferon- α foi determinada por um kit
20 ELISA para interferon- α humano (PBL Biomedical Laboratories).

A Figura 4 apresenta o ciclo de tempo da concentração plasmática de interferon- α após administração de interferon- α encapsulado em micelas poliméricas. A AUC foi aumentada em 32 vezes quando foram utilizadas micelas poliméricas de PEG-PDLA 12-40(65) e em 27 vezes quando
25 foram utilizadas micelas poliméricas de PEG-PHLA 12-40(65), em comparação ao uso de apenas a solução.

Exemplo 12 (Teste 3 de administração intravenosa com interferon- α encapsulado em micelas)

O copolímero em bloco utilizado foi polietilenoglicol-co-poliéster octílico de ácido glutâmico (a seguir denominado PEG-POLG. Neste polímero, os resíduos de ácido glutâmico sem ésteres octílico pertencem à fórmula
30 geral (I), em que R₅ é -O- e R₆ é hidrogênio (o mesmo abaixo nesta exposi-

ção)). Após pesar precisamente 150 mg de PEG-POLG 12-40(65) em um frasco de vidro, 5 ml de tampão MES a 20 mM (pH 5,0) foram adicionados e a mistura agitada vigorosamente durante a noite a 4°C. A dispersão do polímero foi submetida a tratamento ultrassônico por aproximadamente 15 minutos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo), utilizando um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) enquanto resfriada em gelo, para obter uma solução de micelas vazias com concentração de polímero de 30 mg/ml. Uma alíquota de 0,6 ml da solução de micelas vazias foi transferida para um criotubo (Ieda Chemicals Co., Ltd.) e, em seguida, 90 µl de uma solução de interferon-α humano recombinante (IFN-α, PBL Biomedical Laboratories) e 110 µl de tampão MES a 0,1 M (pH 5,0) foram adicionados e a mistura cuidadosamente coletada com pipeta e deixada em repouso a 4°C por 3 dias. Uma alíquota de 400 µl da mesma foi injetada em seguida em um microtubo, tampão MES a 20 mM (pH 5,0) adicionado até completar 500 µl e a mistura lavada com solução de glicose a 5% utilizando uma unidade de ultrafiltração [AMICON^R ULTRA-4 pela Millipore (limite molecular: 100.000)] e concentrada para uso no experimento seguinte com animais.

Ratos Wistar machos de seis semanas de vida foram divididos em grupos de 2 ratos cada, e a solução em teste foi administrada através da veia do rabo em dose de 1×10^6 IU/kg. 5 minutos e 1, 3, 6, 9 e 24 horas após a administração, cerca de 0,2 ml de sangue foram coletados da veia cervical utilizando uma seringa revestida com heparina. O sangue foi centrifugado imediatamente em 13.800 rpm, 4°C (EF-1300, ECO-FugeTM, Tomy Seiko Co., Ltd.) e o plasma foi colhido e armazenado a -30°C até ser analisado. A concentração plasmática de interferon-α foi determinada por um kit ELISA para interferon-α humano (PBL Biomedical Laboratories).

A Figura 5 apresenta o ciclo de tempo de concentração plasmática de interferon-α após administração de interferon-α encapsulado em micelas poliméricas. O encapsulamento em micelas aumentou a AUC em 57 vezes.

Exemplo 13 (Preparo de micelas para encapsulamento de melitina)

O copolímero em bloco utilizado foi PEG-POLA 12-40(65) ou

PEG-POLG 12-40(65). Após pesar precisamente 150 mg de polímero em um frasco de vidro, 5 ml de tampão fosfato de sódio a 20 mM (pH 7,4) foram adicionados e a mistura agitada vigorosamente a 4°C. A dispersão do polímero foi submetida a tratamento ultrassônico por aproximadamente 15 minutos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo), utilizando um Biodisruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) enquanto resfriada em gelo, para obter uma solução de micelas vazias com concentração de polímero de 30 mg/ml. Em seguida à adição de tampão fosfato de sódio a 20 mM (pH 7,4) para ajuste para 10 mg/ml (1 mL), o polipeptídeo básico melitina (Sigma-Aldrich Corp.) (1 mg) foi adicionado e a mistura deixada em repouso durante a noite a 4°C, sendo submetida a seguir à filtração em gel (Sephacrose® CL-4B, GE Healthcare Bioscience, 1φ × 30 cm). A concentração de melitina em cada fração recuperada (eluente: tampão fosfato de sódio a 20 mM (pH 7,4), vazão: 1,0 ml/min, volume de fração: 1 ml) foi analisada utilizando um Ensaio BCA para Proteína (Pierce Corp.). A eficiência do encapsulamento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{(\text{Teor protéico em fração de micela}) \times 100}{\text{Teor protéico total em todas as frações}}$$

A eficiência do encapsulamento foi de 71% para PEG-POLA 12-40(65) e de 48% para PEG-POLG 12-40(65). Os resultados indicam que polipeptídeos com pesos moleculares de aproximadamente 2.800 podem ser encapsulados eficientemente.

Exemplo 14 (Teste 1 de administração intravenosa em ratos de fator estimulador de colônias de granulócitos humano encapsulado em micelas)

O copolímero em bloco utilizado foi polietilenoglicol-copolioctilamida de ácido aspártico (a seguir denominado PEG-PONLA. Este polímero compreende 50% de resíduo de aminoácido da fórmula geral (I), em que R₅ é -NH- e R₆ é um grupo octila, e 50% de resíduo de aminoácido em que R₅ é -NH- e R₆ é um grupo octila substituído com um grupo amino (o mesmo abaixo nesta exposição)). Após pesar precisamente 30 mg de PEG-PONLA 12-40(50) em um frasco de vidro, 2 ml de tampão fosfato a 20 mM

contendo 5% de glicose (pH 7,4) foram adicionados e, em seguida, um Bio-disruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) foi utilizado para sonicação por aproximadamente 10 minutos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo) enquanto resfriados em gelo, para preparar micelas vazias. Fator estimulador de colônias de granulócitos humano recombinante (G-CSF, Green Cross) (pl: aproximadamente 6,0) (300 µg/ml, 1 ml) foi adicionado e a mistura deixada em repouso por todo um dia a 4°C. O G-CSF não-encapsulado foi removido em seguida, utilizando uma unidade de ultrafiltração [AMICON® ULTRA-4 pela Millipore (limite molecular: 100.000)] para preparar micelas para o experimento seguinte com animais.

Ratos Wistar machos de seis semanas de vida foram divididos em grupos de 3 ratos cada (6 ratos por grupo para a solução isolada) e a solução em teste foi administrada através da veia do rabo em dose de 100 µg/kg da solução em teste. 5 minutos e 1, 3, 6, 9 e 24 horas após a administração, cerca de 0,2 ml de sangue foram coletados da veia cervical utilizando uma seringa revestida com heparina. A amostra foi centrifugada imediatamente em 13.800 rpm, 4°C (EF-1300, ECO-Fuge™, Tomy Seiko Co., Ltd.) e o plasma foi colhido e armazenado a -30°C até ser analisado. Um kit ELISA para G-CSF Humano RayBio^R (RayBiotech Inc.) foi utilizado para ensaio de concentração plasmática.

Os resultados do ensaio são apresentados na Figura 6, e os parâmetros farmacocinéticos, calculados de acordo com um modelo não-compartimental, são apresentados na Tabela 2. O encapsulamento em micelas aumentou a AUC em 3 vezes e prolongou a meia-vida em 2 vezes.

Tabela 2 Parâmetros farmacocinéticos para fator estimulador de colônias de granulócitos humano encapsulado em micelas poliméricas ou fator estimulador de colônias de granulócitos humano em solução, após administração intravenosa para ratos.

Parâmetros farmacocinéticos	Solução	Micelas de PEG-PONLA 12-40(50)
AUC _{inf} (% dose/ml·h)	7,4	22
T _{1/2} (h)	2,6	4,1

Parâmetros farmacocinéticos	Solução	Micelas de PEG-PONLA 12-40(50)
Cl (mL/h/corpo)	13	4,4
MRT _{inf} (h)	1,9	2,8
Vss (ml/corpo)	25	13

Exemplo 15 (Teste 2 de administração intravenosa em ratos de fator estimulador de colônias de granulócitos humano encapsulado em micelas)

O copolímero em bloco utilizado foi PEG-POLG. Após pesar precisamente 30 mg de PEG-POLG 12-40(65) em um frasco de vidro, 2 ml de tampão MES a 20 mM (pH 5,0) foram adicionados e, em seguida, um Bi-
 5 odisorruptor (Unidade de Alta Potência, produto da Nissei Corp.) foi utilizado para sonicação por aproximadamente 10 minutos (intervalo de 1 segundo, rendimento: Baixo) enquanto resfriados em gelo, para preparar micelas vazias. Uma solução de G-CSF humano recombinante (Green Cross) (300
 10 µg/ml, 1 ml) foi adicionada e a mistura deixada em repouso por um dia a 4°C. O G-CSF não-encapsulado foi removido em seguida utilizando uma unidade de ultrafiltração [AMICON® ULTRA-4 da Millipore (limite molecular: 100.000)] e diluído com tampão fosfato a 20 mM contendo 5% de glicose (pH 7,4) para uso como micelas para um experimento com animais. As miche-
 15 las foram administradas por via intravenosa para os ratos em dose de 100 µg/ml de G-CSF, na mesma maneira conforme no Exemplo 12. O sangue foi coletado e a concentração, analisada na mesma maneira.

Os resultados são apresentados na Figura 7 e os parâmetros farmacocinéticos calculados de acordo com um modelo não-compartimental,
 20 na Tabela 3. O encapsulamento em micelas poliméricas de granulócitos humano aumentou a AUC em 15 vezes e prolongou a meia-vida em 5 vezes, comparado com a solução, e a concentração plasmática pode ainda ser detectada até mesmo 120 horas após a administração. Estes resultados indicam que a proteína encapsulada em micelas permanece na circulação san-
 25 guínea por tempo prolongado sem liberação inicial.

Tabela 3 Parâmetros farmacocinéticos para fator estimulador de colônias de granulócitos humano encapsulado em micelas poliméricas ou fator estimula-

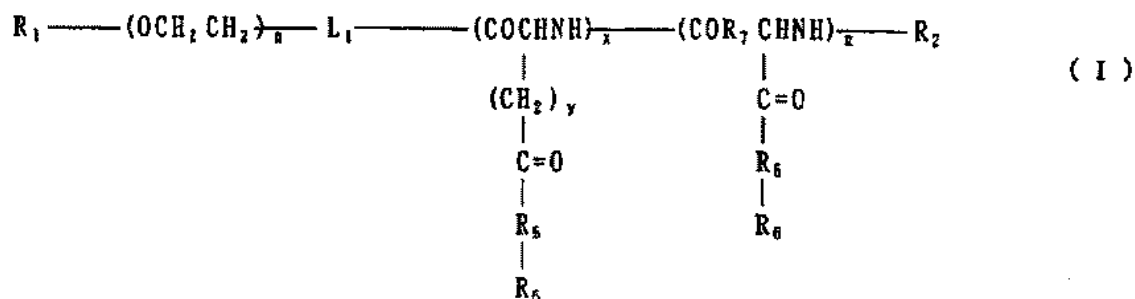
dor de colônias de granulócitos humano em solução após administração intravenosa para ratos.

Parâmetros farmacocinéticos	Solução	Micelas de PEG-POLG 12-40(65)
AUC_{inf} (% dose/ml·h)	7,4	111
$T_{1/2}$ (h)	2,6	14
Cl (mL/h/corpo)	13	0,90
MRT_{inf} (h)	1,9	12
Vss (ml/corpo)	25	11

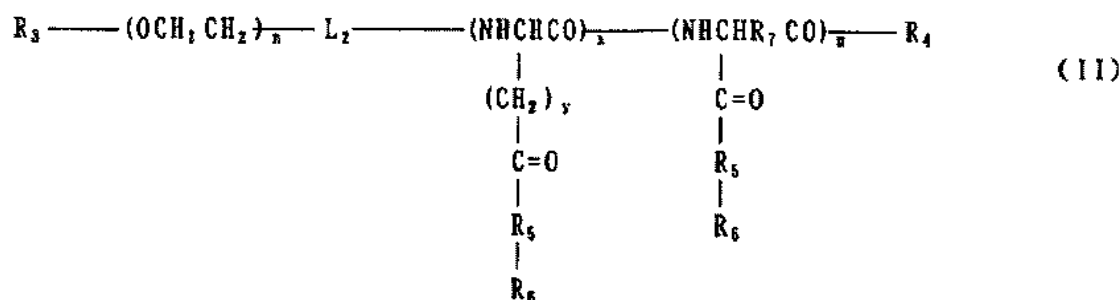
5 A explicação acima da invenção pretende meramente servir para concretização ilustrativa. Deverá ser entendido que várias modificações à mesma poderão ser implementadas como aquelas incluídas no conceito e escopo da invenção. As reivindicações destinam-se, por conseguinte, a serem interpretadas de modo a abranger todas estas modificações.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de micela polimérica de encapsulamento de polipeptídeos ou proteínas, compreendendo um copolímero em bloco com segmentos hidrofílicos, compostos por polietilenoglicol, e segmentos hidrofóbicos, compostos por poliaminoácido selecionado do grupo constituído por aminoácidos ácidos, derivados hidrofóbicos destes e por misturas dos referidos aminoácidos ácidos e os referidos derivados hidrofóbicos.
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que os derivados hidrofóbicos dos aminoácidos ácidos são ésteres alquila de aminoácido ácido ou alquilamidas de aminoácido ácido.
3. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que os aminoácidos ácidos são ácido aspártico e ácido glutâmico.
4. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o copolímero em bloco possui a fórmula (I) ou (II) seguinte:



15 ou



em que R_1 e R_3 representam, cada um independentemente, hidrogênio ou grupo alquila pequeno, seja não-substituído ou substituído com um grupo funcional opcional de proteção, R_2 representa hidrogênio, um grupo C_1 - C_{29} carbonila alifático ou grupo arilcarbonila, saturado ou não-saturado, R_4 re-

apresenta um grupo hidroxila, um grupo C_1-C_{30} óxi ou aril-baixo alquilóxi alifático, saturado ou não-saturado, R_5 representa -O- ou -NH-, R_6 representa hidrogênio, fenila, $-(CH_2)_4$ - fenila, C_4-C_{16} alquila, seja não-substituído ou substituído com grupo amino ou grupo carboxila, ou benzila, R_7 representa metileno, n representa um número inteiro de 10-2500, x representa um número inteiro de 10-300, com a ressalva de que se m estiver presente, as unidades de (COCHNH) e as de (COR₇HNH) serão aleatórias, R_6 poderá ser selecionado para cada unidade de aminoácido, em um copolímero em bloco e estará aleatoriamente presente, porém hidrogênio, como R_6 , constituirá menos de 60% do número tal de R_6 , y representa o número íntegro 1 ou 2, L_1 representa um grupo de ligação, selecionado do grupo constituído por -NH-, -O-, -O-Z-NH-, -CO-, CH₂-, -O-Z-S-Z- e -OCO-Z-NH-, onde cada Z representa independentemente um grupo C_1-C_6 alquileno e L_2 representa um grupo de ligação, selecionado do grupo constituído por -OCO-Z-CO- e -NHCO-Z-CO-, onde Z é um grupo C_1-C_6 alquileno.

5. Composição de acordo com a reivindicação 4, em que a taxa de esterificação ou amidação de poliaminoácidos da cadeia lateral do copolímero em bloco é de 40-100%.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, em que o ponto isoelétrico (pI) da proteína ou polipeptídeo é 3 - 11,5.

7. Método de preparo de composição de micela polimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizada por compreender uma etapa de mistura do copolímero em bloco com a proteína ou polipeptídeo, e ajuste do pH da mistura para um pH diferente do ponto isoelétrico (pI) da proteína ou polipeptídeo para permitir o encapsulamento da proteína ou polipeptídeo na região central hidrofóbica das micelas compostas pelo copolímero em bloco,

em que a relação entre o pI da proteína ou do polipeptídeo, o ponto isoelétrico (pI') do aminoácido ácido e/ou de seus derivados, presentes nos segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco, e o pH diferente daquele do pI é a seguinte:

$$pI > pH > pI'$$

para que os segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco exibam carga negativa no pH, enquanto que a proteína ou polipeptídeo exibem carga positiva, ou esta relação é:

5
$$pI' > pH > pI$$

para que os segmentos hidrofóbicos do copolímero em bloco exibam carga positiva no pH, enquanto que a proteína ou polipeptídeo exibem carga negativa.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o pH possui
10 uma diferença de, pelo menos, 1 do pI da proteína ou do polipeptídeo.

Fig.1

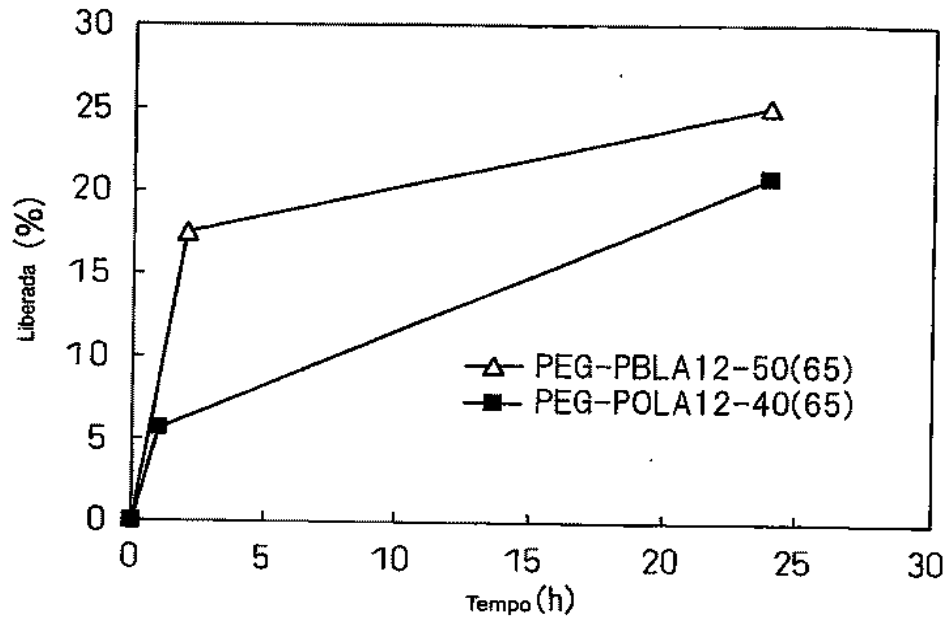


Fig.2

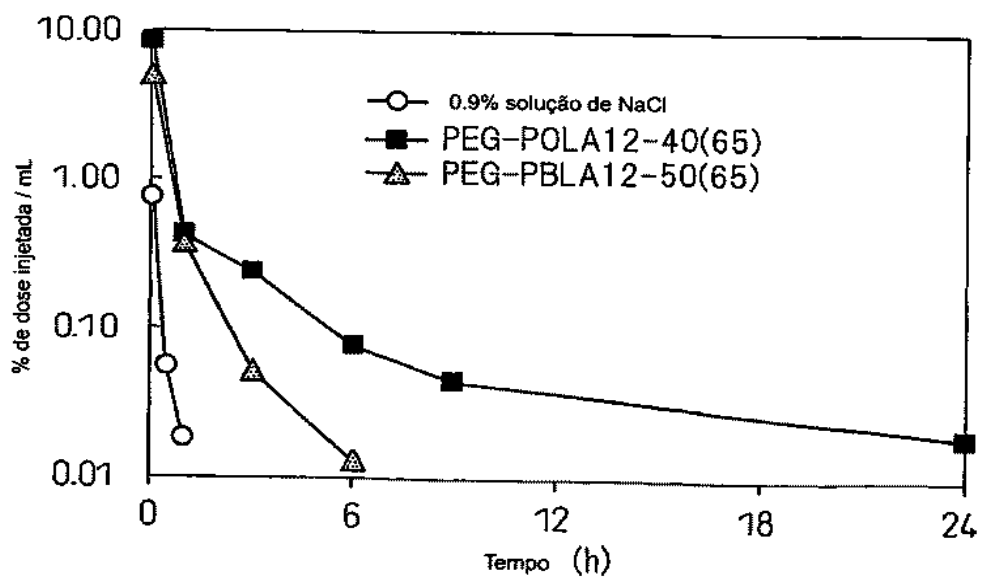
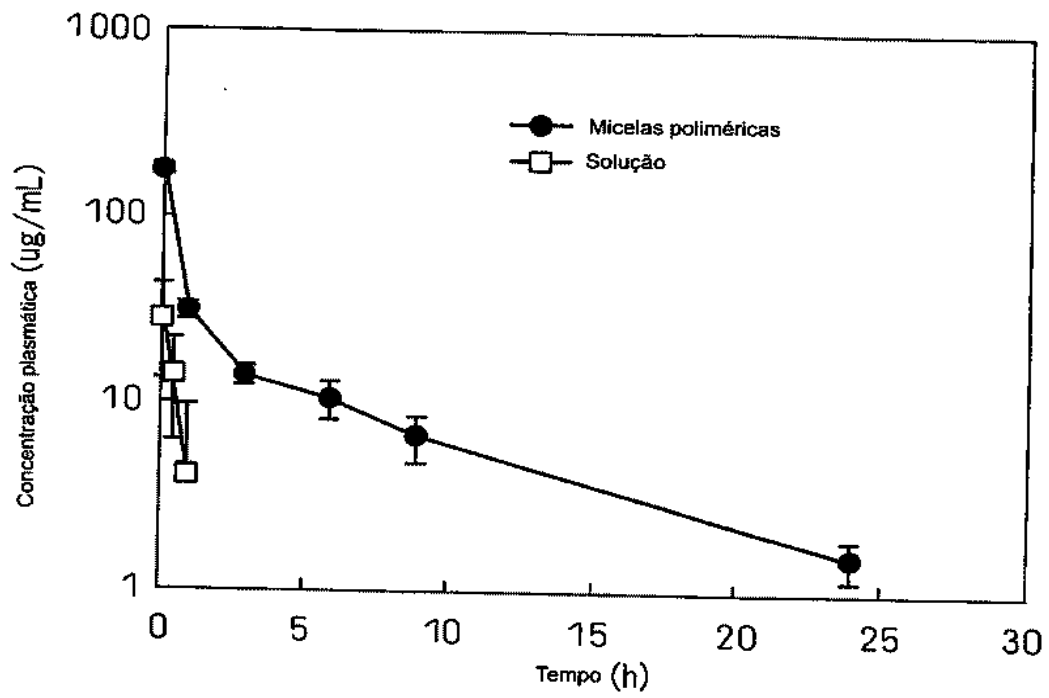


Fig.3



(Média \pm SD、n=3)

Fig.4

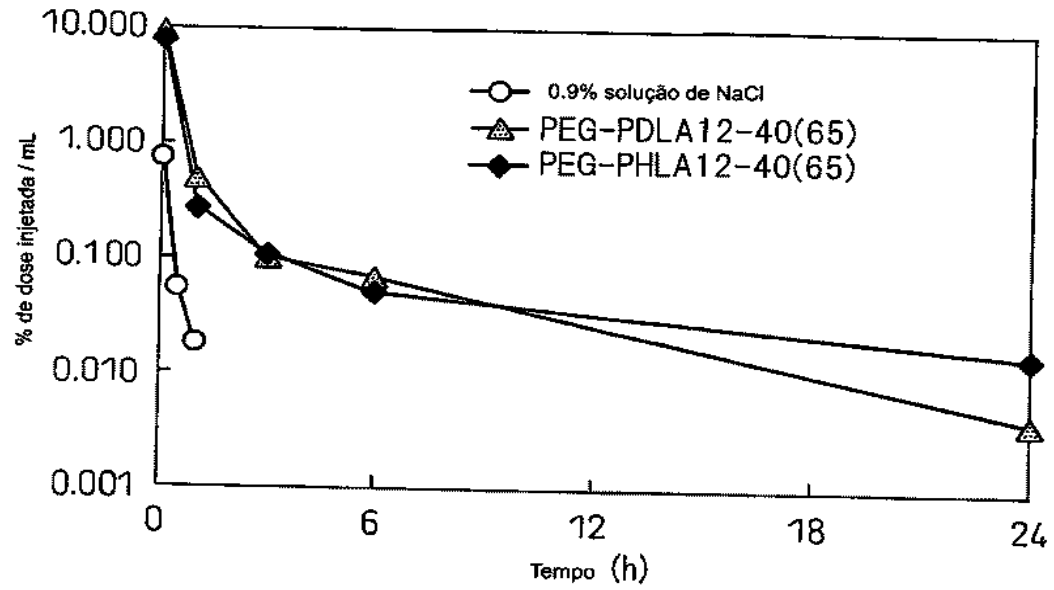


Fig.5

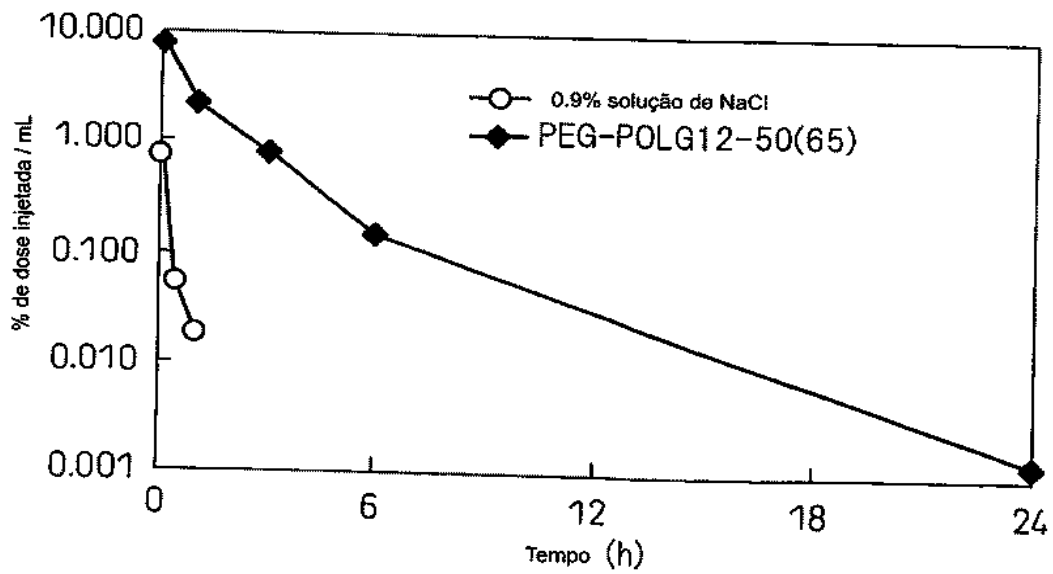


Fig.6

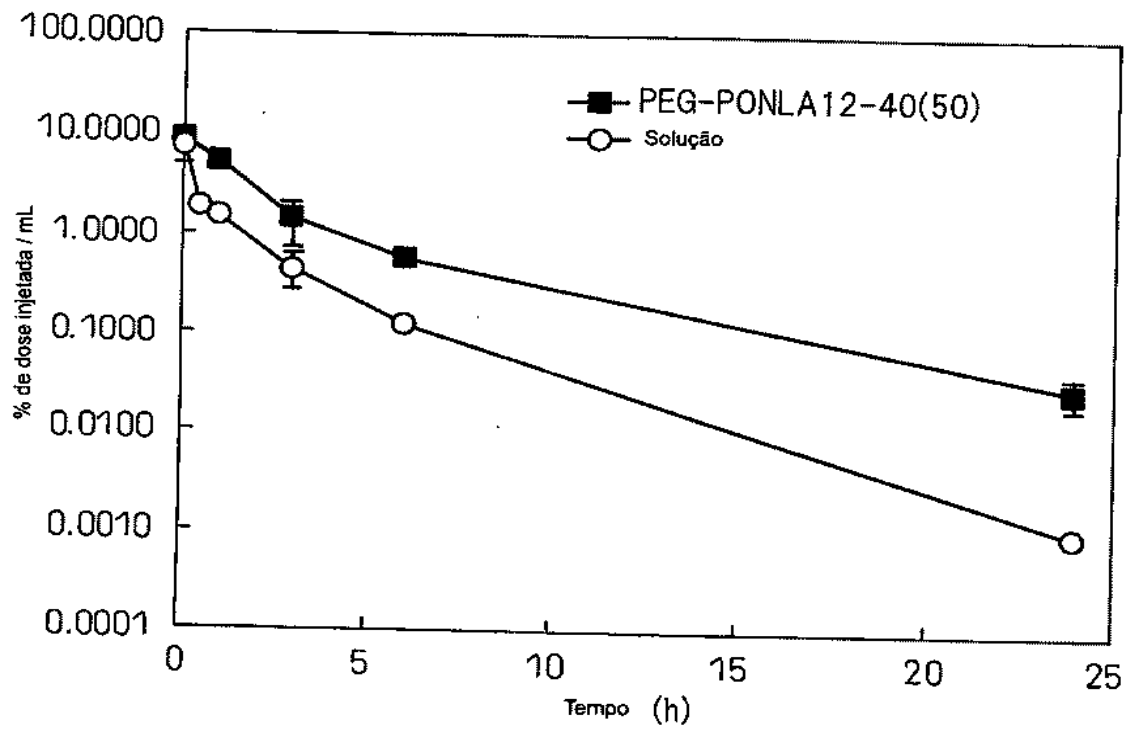
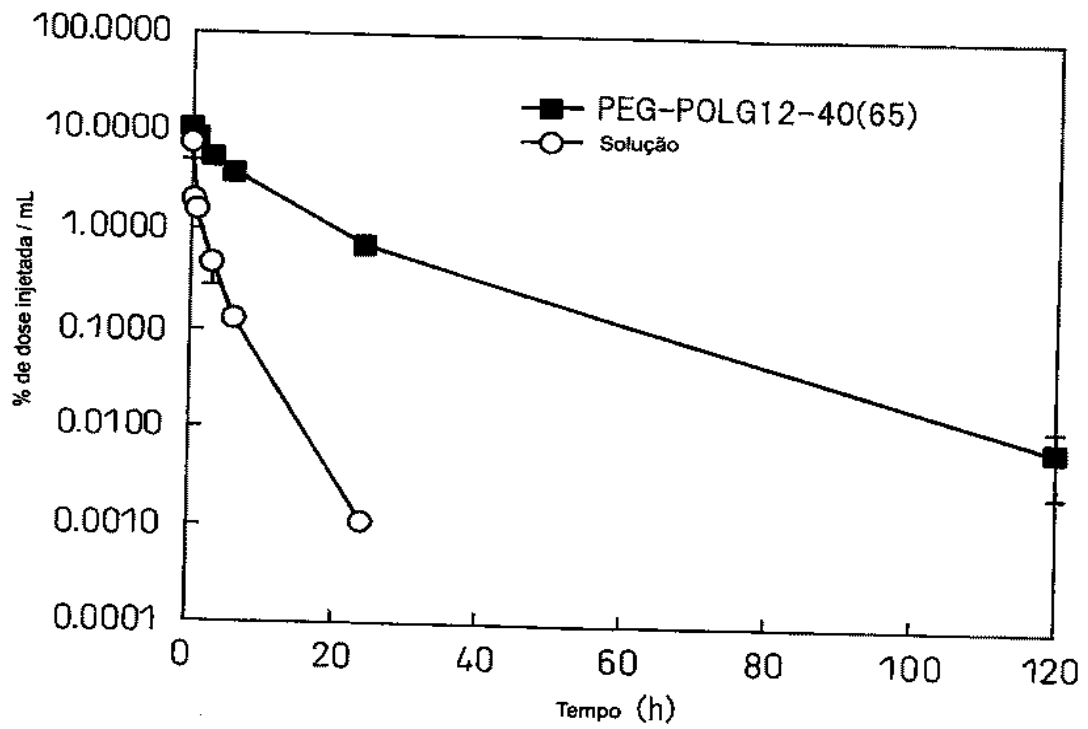


Fig.7



RESUMO

Patente de Invenção: "POLIPEPTÍDEO FISIOLÓGICAMENTE ATIVO, MICELA POLIMÉRICA COM PROTEÍNA EM SEU INTERIOR E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DA MICELA POLIMÉRICA".

- 5 A presente invenção refere-se a uma composição de micela polimérica, derivada de copolímero em bloco, para encapsulamento de polipeptídeo ou de proteína fisiologicamente ativo, compreendendo segmentos hidrofílicos e segmentos hidrofóbicos.