

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da  
Propriedade Intelectual  
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional  
**WO 2013/084207 A1**

(43) Data de Publicação Internacional  
13 de Junho de 2013 (13.06.2013) W I P O I P C T

- (51) Classificação Internacional de Patentes :  
A61K 9/107 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)  
A61K 47/42 (2006.01) A61K 8/06 (2006.01)  
A61K 47/18 (2006.01) A61Q 5/00 (2006.01)  
A61K 31/54 (2006.01) C11D 1/00 (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional : PCT/IB20 12/057082
- (22) Data do Depósito Internacional : 7 de Dezembro de 2012 (07.12.2012)
- (25) Língua de Depósito Internacional : Português
- (26) Língua de Publicação : Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade : 106047 7 de Dezembro de 2011 (07.12.2011) PT
- (71) Requerente : UNIVERSIDADE DO MINHO [PT/PT]; Largo do Paço, P-4700-320 Braga (PT).
- (72) Inventores : CAVACO PAULO, Artur Manuel; Departamento De Eng. Têxtil Da Universidade Do Minho, Campus De Azurém, P-4800-058 Guimarães (PT). FERREIRA CASTRO GOMES, Andreia; Departamento De Biologia Da Universidade Do Minho, Campus De Gualtar, P-4710-057 Braga (PT). JESUS MARQUES SILVA, Raquel; R. Da Boavista, N° 402 Sta Leocádia, Guimarães, P-4805-473 Santa Leocádia Briteiros (PT). SÁ LOUREIRO, Ana Isabel; R. Ribeiro Da Regadias, N° 288, Barcelos, P-4750-513 Lama BCL (PT). LOPES PRETO DE ALMED3A, Ana Arminda; Departamento De Biologia Da Universidade Do Minho, Campus De Gualtar, P-4710-057 Braga (PT).
- (74) Mandatário : VIEIRA PEREIRA FERREIRA, Maria Silvina; Clarke, Modet & Co., Rua Castilho, 50-9°, P-1269-163 Lisboa (PT).
- (81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicado:**

- com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))
- antes da expiração do prazo para modificar as reivindicações e a republicar na eventualidade de receção de tais modificações (Regra 48.2(h))
- com listagem de sequências, parte da descrição (Regra 5.2(a))

(54) Title : FORMULATIONS FOR MICELLE FORMATION COMPRISING A PROTEIN AND METHODS PREPARATION THEREOF

(54) Título : FORMULAÇÕES MICELARES PROTEICAS E RESPECTIVO MÉTODO DE PRODUÇÃO

(57) Abstract : The present invention describes micellar protein formulations for the controlled release of active ingredients, and method for preparing the same. The invention describes a new micelle composition for use in pharmaceuticals, cosmetics and detergents. In particular, it describes micelle formation formulations that comprise: · an aqueous phase containing a protein or a natural or synthetic peptide; · a lipophilic phase containing a hydrophobic compound; · an adjuvant dissolved in the aqueous phase to regulate the size and stability of the micelles; the size of the micelles varying from 30 to 5000 nm, preferably from 30 to 100 nm, wherein the micelles can be obtained by two different methods, namely using ultrasound or a high-pressure homogeniser. The preparation method involves two distinct phases: an aqueous phase and a lipophilic phase. The aqueous phase can be water or any buffer that is best suitable for a given use, such as an aqueous solution of bovine serum albumen (BSA); human serum albumen (HSA); silk fibroin or a polypeptide fibroin.

(57) Resumo : A presente invenção descreve em formulações micelares proteicas para libertação controlada de agentes e respetivo método de produção. A invenção descreve numa nova composição de micelas para aplicações farmacêuticas, cosméticas e detergentes. Nomeadamente, formulações para a formação de micelas que compreendem: · uma fase aquosa contendo uma proteína ou um péptido natural ou sintético; · uma fase lipofílica que compreende um composto hidrofóbico; · um agente adjuvante dissolvido na fase aquosa que regula o tamanho e estabilidade das micelas; em que os tamanhos das referidas micelas varia entre 30 a 5000 nm, de preferência de 30-100 nm, as referidas micelas podem ser obtidas a partir de duas metodologias diferentes, nomeadamente ultra-sons ou homogeneizador de alta pressão. O método de preparação envolve duas fases distintas: fase aquosa e fase lipofílica. A fase aquosa pode ser água ou qualquer tampão que mais se adequa para uma determinada aplicação, como por exemplo uma solução aquosa de albumina sérica bovina (BSA); albumina sérica humana (HSA); fibroína da seda ou de um polipéptido.



WO 2013/084207 A1

**DESCRIÇÃO**  
**FORMULAÇÕES MICELARES PROTEICAS E RESPECTIVO MÉTODO DE**  
**PRODUÇÃO**

**Campo da invenção**

A presente invenção descreve em formulações micelares proteicas para libertação controlada de agentes, com base em polímeros naturais, mais concretamente proteínas e péptidos. Mais especificamente, a produção das micelas com material polimérico é efetuada com processos que envolvem elevada quantidade de energia, nomeadamente ultra-sons e homogeneizador de alta pressão, de forma a obter formulações com micelas que possuem um diâmetro entre 30 a 5000 nm com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade dos princípios ativos para diferentes aplicações farmacêuticas tópica e/ou intravenosa, cosméticas e detergência.

**Antecedentes da invenção**

Os sistemas vesiculares, como lipossomas, micelas poliméricas, conjugados de polímeros, micro e nanopartículas, possuem diversas e importantes aplicações, incluindo a microencapsulação de corantes, aromas, perfumes e cosméticos, cremes, libertação de fármacos, agentes de contraste para ressonância magnética e ecocardiografia, estudo da estrutura da membrana, função e reactividade. Na verdade, os sistemas vesiculares continuam em desenvolvimento e têm atraído grande interesse no desenvolvimento de novas formulações, devido à capacidade que possuem de libertar diferentes tipos de drogas, hidrofílicas e lipofílicas, em áreas específicas do corpo. Em comparação com as formas farmacêuticas convencionais, estes sistemas proporcionam inúmeras vantagens, incluindo o aumento do índice terapêutico. Além disso, esses veículos

transportadores superam alguns problemas de estabilidade e solubilidade de fármacos em fluidos biológicos.

Uma grande parte das nanoparticulas é obtida a partir de polímeros sintéticos como o ácido poliláctico, poliortoésteres , etc. , e naturais como por exemplo lipídios, oligopeptídios , polissacarídeos , quitosano, dextrinas, proteínas, entre outros.

As nanoparticulas são assim, consideradas sistemas altamente promissores no domínio da vectorização de agentes bioactivos, pois as suas propriedades físico-químicas podem ser moduladas através de uma correcta selecção de diversos parâmetros operacionais apresentando assim uma elevada capacidade de transportarem uma grande diversidade de substâncias .

As nanoparticulas proteicas têm sido mencionadas na literatura, como sistemas transportadores de fármacos ou como agentes de diagnóstico. No entanto, alguns dos obstáculos encontrados à nanoencapsulação devem-se à utilização de solventes orgânicos e de temperaturas elevadas susceptíveis de causar danificação no material a encapsular, como por exemplo nos fármacos (nos documentos US N° 3,886,084; 3,937,668; 4,357,259) (Vassiliades 1975; Zolle 1976; Oppenheim 1978) . As nanoparticulas de albumina podem ser preparadas por desnaturação a partir do aumento de temperatura ou através do uso de agentes "crosslinking" . Neste processo uma solução aquosa de proteína é adicionada a um líquido imiscível ou a uma fase oleosa. As gotas da solução proteica são dispersas através de uma elevada agitação, sendo posteriormente estabilizadas com um aumento de temperatura (100° C e os 150° c) para formar nanoparticulas (Leucuta et al. 1988). Este método possui uma limitação do material a encapsular, pois não permite o encapsulamento de agentes sensíveis ao calor. O método de

"crosslinking" químico baseia-se na adição de glutaraldeído à emulsão para que ocorra a ligação química entre o glutaraldeído e a proteína efectuando-se logo de seguida as lavagens para depois proceder-se ao seu armazenamento (Lee et al. 1981). A grande desvantagem desta técnica é o uso de agentes "crosslinking" que apresentam de uma forma geral uma elevada toxicidade. Mais tarde, surgiram novas técnicas de preparação de nanoparticulas de proteína sem recorrer ao uso de temperaturas elevadas ou até mesmo de agentes "crosslinking", como está referido no documento US N° 4,357,259 (Senyei 1982). Este método refere-se apenas ao encapsulamento de compostos solúveis em água não usando adjuvantes, apresentando tempos de preparação superiores a 1 hora e o envolvimento de múltiplas técnicas (agitação seguida de sonicação) para a obtenção de partículas com tamanhos superiores a 1000 nm.

Diversos documentos e artigos sobre o aperfeiçoamento de produção de nanoparticulas foram surgindo ao longo destes anos (US N°: 5,069,936; WO 91/06286; US N°: 6,592,844; US 2004/0043077; US2 007/0122 465; US2 008/02332 01) (Yen 1991; Mathiowitz 1993; Coombes 2002; Brown 2004; Royere 2008). Um elevado número de processos tem sido utilizado na produção de nanoparticulas para uma grande diversidade de aplicações, nomeadamente, sistemas de ultra-sons, e o homogeneizador de alta pressão, uma vez que estes aumentam o potencial efeito de agitação/mistura acelerando uma grande variedade de processos químicos e físicos.

A produção de nanoparticulas de proteínas através de sistemas de ultrasons tem sido explorada. Albnex é um produto aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), que consiste em micropartículas de albumina produzidas por ultra-sons sendo estas aplicadas por via intravenosa, como agente de contraste para ultra-sonografia e como um eco-

agente de contraste para ecocardiograma (Grinstaff and Suslick 1991) . No entanto, a escolha da proteína, assim como, os materiais a encapsular nestas nanopartículas, permitem uma infinidade de aplicações biomédicas. Algumas das aplicações das nanopartículas biocompatíveis incluem agentes de contraste para ressonância magnética e ecocardiografia e novos sistemas de libertação controlada (Suslick and Grinstaff 1990) . Todas estas aplicações e procedimentos estão descritos nos documentos US N° : 5,362,478; 5,439,686; 5,505,932; 5,508,021; 5,512,268; 5,635,207; 5,639,473; 5,650,156; 5,665,382; 5,665,383; 7,217,410 B2 7 (Desai 1994; Desai 1995; Grinstaff 1996; Grinstaff 1996; Grinstaff 1996; Grinstaff 1997; Grinstaff 1997; Grinstaff 1997; Grinstaff 1997; Grinstaff 1997; Desai 2003; Suslick 2007) . Os documentos US N° : 5,916,596 e 2003/0133955 (Desai 1999; Desai 2003) mencionam o uso de ultra-sons e homogeneizador de alta pressão, obtendo nanopartículas de proteínas com diferentes tamanhos, de acordo com a técnica utilizada. Todas estas patentes acima mencionadas, referem a formação de nano/micropartículas a partir de ligações dissulfídicas entre os resíduos Cisteína presentes nas proteínas, e/ou o uso de agentes "crosslinking" capazes de promover essas ligações dissulfídicas ; atribuindo ainda a estabilidade ao longo do tempo destas partículas, a essas ligações que se estabelecem a quando a sua formação.

### **Sumário da Invenção**

A presente invenção descreve formulações micelares proteicas para libertação controlada de agentes e respectivo método de produção. A invenção consiste numa nova composição de micelas para aplicações farmacêuticas,

cosméticas e detergentes. Nomeadamente, formulações para a formação de micelas que compreendem:

- uma fase aquosa contendo uma proteína ou um péptido natural ou sintético;
- uma fase lipofílica que compreende um composto hidrofóbico ;
- um agente adjuvante dissolvido na fase aquosa que regula o tamanho e estabilidade das micelas;

em que os tamanhos das referidas micelas varia entre 30 a 5000 nm, de preferência de 30-100 nm, as referidas micelas podem ser obtidas a partir de duas metodologias diferentes, nomeadamente ultra-sons e homogeneizador de alta pressão.

O método de preparação envolve duas fases distintas: fase aquosa e fase lipofílica. A fase aquosa pode ser água ou qualquer tampão que mais se adequa para uma determinada aplicação, como por exemplo uma solução aquosa de albumina sérica bovina (BSA) ; albumina sérica humana (HSA) ; fibroína da seda ou de um polipéptido.

A presente invenção descreve formulações para a formação de micelas que compreende:

- uma fase aquosa contendo uma proteína ou um péptido natural ou sintético;
- uma fase lipofílica que compreende um composto hidrofóbico ;
- um agente adjuvante dissolvido na fase aquosa que regula o tamanho e estabilidade das micelas;

em que os tamanhos das referidas micelas varia entre 30-5000 nm, de preferência de 30-100 nm.

Uma outra realização é uma formulação que contém a seguinte composição

- 50-99,5 % v/v da fase aquosa a qual contem 0,1-8 g/l de um agente adjuvante dissolvido, de preferência de 2-6 g/L, ainda mais de preferência 4-5 g/L;
- 0,1-50% v/v uma fase lipofilica, de preferência entre 0,1-5 %, ainda mais de preferência de 0,5-2,5 %.

Numa outra realização ainda mais preferencial, a fase aquosa das formulações descritas compreende pelo menos uma das seguintes soluções:

- albumina sérica bovina (BSA) ;
- albumina sérica humana (HSA) ;
- fibroina da seda
- um polipéptido N-C terminal seis aminoácidos GAGAGS; GAGAGA; GAGSGS; GSGSGS; GAGAGL; GAGLGL; GLGLGL; GDGDGD; GAGAG<sub>D</sub>; GAGDGD;
- ou péptidos com diferentes aminoácidos DAAGAAAA; DDAAGAAAA; DDDAAGAAAA; DDDDAAGAAAA; DAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAA ; DDDDAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAA ;
- péptidos com vinte e dois aminoácidos ILLRKLHVPPFFPIGFRGRPAAS; ILLRKLHVPI IPIGIRGRPAAS ; ILLRKLHV PWWPIGWRGRPAAS ; ILLRKLHVPPYPIGYRGRPAAS ; ILLRKLHVAHGAIGIRGRPAAS ; ILLRKLHVCHGCIGIRGRPAAS ;
- péptidos com catorze aminoácidos; KRCCPDTCGIKCLD; KRSSPDTSGIKSLD; KRYYPDTYGIKYLD; KRHPDTHGIKHL D; KRFFPDTFGIKFLD; KRLLPDTLGIKLLD .

Nas diversas realizações da presente invenção, verificou-se que os péptidos com maior número de aminoácidos - isto é, a partir de 6 aminoácidos, de preferência a partir de 10 aminoácidos; sendo estes hidrofóbicos, permitem a formação de micelas com tamanho mais reduzido.

No que se refere ao aperfeiçoamento das micelas proteicas, a variação da fracção do composto hidrofóbico entre 0,1-50% v/v, que compõe a fase lipofílica, interfere no diâmetro das micelas, assim como, na estabilidade destas ao longo do tempo (i.e., menores % maior estabilidade). Com diferentes concentrações de proteína, bem como diferentes percentagens de agente adjuvante, as propriedades físico-químicas das micelas são também influenciadas. O aumento de concentração de proteína e a diminuição da fracção lipídica leva a uma redução do tamanho das micelas e a amostras mais homogêneas e mais estáveis nomeadamente, concentrações superiores a 1 g/L de albumina e fracções lipídicas inferiores a 20%.

Numa outra realização ainda mais preferencial, as formulações descritas na presente invenção podem opcionalmente conter um composto ativo hidrofílico nomeadamente o diclonofenac, ou o piroxicam, entre outros.

Numa outra realização ainda mais preferencial, as formulações descritas na presente invenção podem ainda conter um agente alvo - "*agente targeting*" - de reconhecimento de determinadas células na fase aquosa ou fase lipofílica, nomeadamente o ácido fólico.

Numa outra realização ainda mais preferencial, a fase lipofílica das formulações descritas na presente invenção compreende pelo menos uma das seguintes soluções o n-dodecano; óleo vegetal, óleo alimentar, entre outras. Numa outra realização ainda mais preferencial, a fase lipofílica poderá ainda conter:

- pelo menos um composto ativo hidrofóbico, seleccionado do seguinte grupo taxol, celecoxib, piroxicam, CORMS ou;



- pelo menos um composto seleccionado do seguinte grupo fragâncias, perfumes, ou óleos essenciais.

Numa outra realização ainda mais preferencial, das formulações descritas na presente invenção o agente adjuvante poderá ser um surfactante ou um polímero. Ainda mais de preferência o agente adjuvante pode ser seleccionado do seguinte grupo polisorbato 80; poloxamer 407; dodecil sulfato de sódio; álcool polivinílico ou ácido plurónico, entre outros.

Numa outra realização ainda mais preferencial, das formulações descritas na presente invenção contem uma fase aquosa que compreende uma solução de albumina; uma fase lipofílica compreender um óleo vegetal e pelo agente adjuvante ser poloxamer. A formulação poderá ainda conter aditivos, compostos activos, fragâncias, etc.

As formulações descritas na presente invenção poderão ser usadas em medicina i.e. como medicamento ou como composição framaçeuticas , ou como cosmético nomeadamente em composições cosméticas, ou como detergente (sólidos ou líquidos) .

Numa outra realização, as composições farmacêuticas que compreendem as formulações micelares descritas na presente invenção poderão ser ministrada por via tópica, oral, parental, injectável, nomeadamente para aplicação intravenosa, subcutânea e intramuscular.

Numa outra realização, as composições cosméticas que compreendem as formulações micelares descritas na presente invenção poderão as composições cosméticas anterior caracterizadas por terem a forma de creme, loção ou gel, nomeadamente usadas no tratamento de problemas de pele ou cabelo .

Uma outra realização preferênciã descreve um método de preparação das formulações para a formação das micelas descritas na presente invenção, por serem obtidas a partir de duas metodologias diferentes, nomeadamente por ultrasons ou por um homogeneizador de alta pressão.

#### **Descrição detalhada da invenção**

Na presente invenção as micelas são produzidas por ultrasonificação ou por homogeneização de alta pressão, de uma fase aquosa contendo uma proteína ou um péptido natural ou sintético; uma fase lipofílica esteja compreendida por um composto hidrofóbico e um agente adjuvante, não sendo necessário a utilização de agentes de "crosslinking" ou iniciadores. Desta forma, é possível a formação de micelas proteicas com um diâmetro reduzido (30 -5000 nm) através de um único passo de processamento da composição descrita, eliminando-se passos intermédios como por exemplo a evaporação de solventes orgânicos utilizados como agentes de "crosslinking". Pela aplicação destas técnicas de elevada energia e pela presença do adjuvante são obtidas pequenas micelas, onde a proteína se encontra localizada na interface óleo/água, como uma fina camada de revestimento de superfície. As micelas proteicas produzidas são ideais para diversas aplicações que vão desde a indústria farmacêutica, à cosmética e detergência.

A presente invenção consiste numa nova formulação e respectivo método de preparação de formação de micelas para aplicações farmacêuticas, cosméticas e detergência, as formulações descritas na presente invenção permitem aumentar o rendimento de formação de micelas superior a 90% e a eficácia de encapsulamento dos compostos nas micelas proteicas obtidas por estas formulações é superior a 80%.

De acordo com a presente invenção, esta propõe composições proteicas para libertação controlada, para aplicações "in vivo".

O termo "libertação controlada in vivo" refere-se à libertação de material biológico ou não biológico a partir da administração oral, intravenosa, subcutânea, intramuscular, tópica, etc.

O termo "composto activo" refere-se agentes farmacêuticos ativos como os agentes analgésicos, agentes anti-inflamatórios, agentes antibióticos, agentes antifúngicos, agentes anticancerígenos, entre outros.

O termo "composto não activo" refere-se por exemplo a fragrâncias ou óleos essenciais, entre outros.

O método compreende a obtenção de micelas de proteína, a partir de uma elevada quantidade de energia. Esta energia pode ser obtida a partir de o uso de ultra-sons, ou pelo uso de homogeneizador de alta pressão ou até mesmo a partir de uma placa de agitação, dependendo se se pretende obter amostras mais homogêneas e tamanhos mais pequenos ou se pretende utilizar pequenas concentrações de proteínas.

Qualquer proteína pode formar este tipo de micelas. O termo "proteína" engloba proteínas, péptidos, polipéptidos, poliaminoácidos, naturais ou sintéticos.

O método de preparação envolve duas fases distintas: fase aquosa e fase lipofílica, recorrendo-se a técnicas de elevada energia, nomeadamente o ultra-sons e homogeneizador de alta pressão. Na fase aquosa o solvente poderá ser água ou qualquer tampão que mais se adequa para uma determinada aplicação, como por exemplo uma solução aquosa de albumina sérica bovina (BSA); albumina sérica humana (HSA); fibroína da seda ou de um polipéptido de acordo com as seguintes sequências (N-C terminal: péptidos com seis aminoácidos GAGAGS; GAGAGA; GAGSGS; GSGSGS; GAGAGL; GAGLGL; GLGLGL;

GDGDGD; GAGAGD; GAGDGD; ou péptidos com diferentes aminoácidos DAAGAAAA; DDAAGAAAA; DDDAAGAAAA; DDDDAAGAAAA; DAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAA ; DDDDAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAA ; péptidos com vinte e dois aminoácidos ILLRKLHVPPFFPIGFRGRPAAS ; ILLRKLHVPI IPIGIRGRPAAS ; ILLRKLHV PWWPIGWRGRPAAS ; ILLRKLHVPPYPIGYRGRPAAS ; ILLRKLHVAHGAIGIRGRPAAS ; ILLRKLHVCHGCIGIRGRPAAS ; péptidos com catorze aminoácidos; KRCCPDTCGIKCLD; KRSSPDTSGIKSLD; KRYPDPTYGIKYLD; KRHPDTHGIKHL D; KRFFPDTFGIKFLD; KRLLPDTLGIKLLD . Estes péptidos sintéticos variam na sua composição, no que se refere ao número e tipo de aminoácidos, possibilitando controlo do tamanho das micelas. Os péptidos com maior número de aminoácidos-isto é a partir de 6 aminoácidos, de preferência a partir de 10 aminoácidos; sendo estes hidrofóbicos, permite a formação de micelas com tamanho mais reduzido. Esta fase poderá conter ainda um composto activo, sendo este hidrofílico, tal como por exemplo o diclofenac.

A fase lipofílica poderá ser qualquer solvente que seja imiscível com fase aquosa de modo a formar duas fases distintas, como por exemplo n-dodecano (solvente orgânico) ou óleo vegetal ou óleo alimentar, entre outros. Os compostos activos hidrofóbicos, tais como por exemplo, o celecoxib, taxol, piroxicam ou compostos não activos como fragâncias deverão ser adicionados nesta fase.

A adição de um terceiro componente a esta composição, designado por agente adjuvante, irá influenciar as propriedades das micelas: o tamanho, polidispersividade e o seu potencial de superfície. O processo de formação de micelas é um fenómeno complexo que ainda não foi completamente esclarecido.

A adição do agente adjuvante é efetuada na fase aquosa à temperatura ambiente, antes de submeter ao tratamento do ultra-sons ou do homogeneizador. Como adjuvantes entende-se o uso de qualquer surfatante ou qualquer polímero que tenha a capacidade diminuir a tensão superficial e de estabilizar as micelas. O mecanismo deste agente adjuvante não está totalmente esclarecido, podemos utilizar com agente adjuvante um surfactante ou polímero capaz de diminuir a tensão superficial e de estabilizar as micelas como por exemplo, o polisorbato 80 (Tween 80); poloxamer 407; o dodecil sulfato de sódio (SDS); o álcool polivinílico (PVA) ou ácido plurónico (F-68 e o F-127). Assim, é possível a obtenção de micelas com tamanhos que variam entre os 30-5000 nm. Os tamanhos obtidos permite com que estas micelas sejam compatíveis com diversas vias de administração, incluindo intravenosa, intradérmica, subcutânea, transdérmica (por exemplo, tópica) e transmucosa.

No que se refere ao aperfeiçoamento das micelas proteicas, a variação da fracção do composto hidrofóbico entre 0,1-50% v/v, que compõe a fase lipofílica, interfere no diâmetro das micelas, assim como, na estabilidade destas ao longo do tempo (i.e., menores % maior estabilidade). Com diferentes concentrações de proteína, bem como diferentes percentagens de agente adjuvante, as propriedades físico-químicas das micelas são também influenciadas. O aumento de concentração de proteína e a diminuição da fracção lipídica leva a uma redução do tamanho das micelas e a amostras mais homogêneas e mais estáveis nomeadamente, concentrações superiores a 1 g/L de albumina e fracções lipídicas inferiores a 20%. Opcionalmente, pode ainda ser adicionado um agente "targeting". Diferentes agentes "targeting" podem ser adicionados consoante o alvo. O objectivo é permitir o reconhecimento específico de determinadas células alvo a

serem tratadas, como por exemplo as micelas podem ser direccionadas para locais de inflamação dado que esses locais têm macrófagos activados que possuem o receptor de folato à superfície. Opcionalmente, o agente alvo - "targeting" poderá ser o ácido fólico. O agente de "targeting" pode encontrar-se ligado à proteína utilizada para a formação das micelas. Desta forma, uma determinada razão de uma solução desta proteína ligada ao folato é adicionada à fase aquosa da composição aquando da preparação. No presente trabalho, após várias etapas de optimização determinou-se que a utilização da razão de 1/100 de BSA ligada a folato/BSA permitiu a detecção de folato à superfície das micelas.

#### **Descrição detalhada**

Seguidamente serão apresentados exemplos que não deverão ser considerados limitativos.

#### **Exemplo 1 - Obtenção de micelas proteicas contendo um fármaco anti-inflamatório (Piroxicam), a partir do método sonoquímico, para aplicação em queimaduras de pele humana**

A proteína usada neste exemplo foi a albumina de sérica bovina (BSA). A composição utilizada para a preparação destas micelas proteicas consiste numa fase aquosa de BSA com uma concentração de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  (87% de fase aquosa), numa fase lipofílica presente em baixa percentagem (5% de óleo alimentar) e 8 g/L de agente adjuvante, o álcool polivinílico. O fármaco lipofílico usado foi o piroxicam (3 mM), sendo este um anti-inflamatório. A sonda ultrasónica foi posicionada na interface (aquosa:lipofílica) aplicando uma amplitude de 40% com uma temperatura inicial de  $10^\circ \text{C}$ , dentro do reactor de vidro, durante 3 minutos.

Após obtenção das micelas acima referidas, estas foram sujeitas a uma exaustiva caracterização físico-química. As micelas foram submetidas à centrifugação e sucessivas lavagens com o objectivo de as separar da solução mãe de proteína e do piroxicam que ficou por encapsular. A capacidade da proteína para formar micelas, foi obtida através da quantificação de proteína que ficou no sobrenadante, verificando-se um rendimento de formação de micelas superior a 90%. A eficácia de encapsulamento do piroxicam nas micelas proteicas foi de 80%. A distribuição de tamanhos foi obtida através da técnica de espectroscopia de correlação fotónica no equipamento designado Zeta Sizer NS, apresentando micelas com diâmetros de 280 nm e com uma polidispersividade de 0.090. A carga superficial destas micelas foi medida em termos de potencial zeta obtido no Zeta Sizer NS, apresentando carga negativa (-4 mV). Estas micelas foram também analisadas por microscopia electrónica de varrimento com o objectivo de determinar a morfologia, apresentando uma forma esférica. Estas micelas evidenciaram grande estabilidade ao longo de dois meses. Ensaios de citotoxicidade revelaram que estas micelas proteicas apresentaram baixa citotoxicidade quando testadas em linhas celulares humanas (fibroblastos humanos- BJ5ta).

A aplicação tópica destas micelas contendo o agente anti-inflamatório, foi efectuada em equivalentes a pele humana com espessura completa. Provocou-se uma queimadura aplicando-se em seguida as referidas micelas, verificando-se que após 6 dias de tratamento houve uma melhor cicatrização quando comparado com o controlo comercial à base de colagénio (Suprasorb c). Além disso, o custo monetário deste tipo de formulação obtido com micelas proteicas é considerado baixo em comparação com o colagénio que é bastante dispendioso.

**Exemplo 2 - Obtenção de micelas proteicas contendo um fármaco anti-inflamatório (celecoxib), a partir do método por homogeneização de alta pressão, para aplicação intravenosa em doenças anti-inflamatórias.**

A proteína usada neste exemplo foi a albumina de sérica bovina (BSA). A composição utilizada para a preparação destas micelas proteicas consiste numa fase aquosa de BSA com uma concentração de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  (99% de fase aquosa), numa fase lipofílica presente em baixa percentagem (0.5% de óleo alimentar) e 0.5% de agente adjuvante, o polisorbato 80. A esta composição pode ainda ser adicionado um agente de "targeting", ácido fólico (FA). O método de preparação destas micelas consiste na homogeneização, à temperatura ambiente, da solução proteica contendo o agente adjuvante com a fase lipofílica, a qual contém o fármaco lipofílico dissolvido numa concentração de  $20 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Esta composição foi sujeita a 26 ciclos utilizando pressões elevadas nos dois estágios de pressão presentes no homogeneizador (Pressão no estágio 1 de aproximadamente 580 bar e Pressão no estágio 2 de aproximadamente 240 bar).

Após obtenção das micelas acima referidas, estas foram sujeitas a uma exaustiva caracterização físico-química. A distribuição de tamanhos foi obtida através da técnica de espectroscopia de correlação fotónica no equipamento designado Zeta Sizer NS, apresentando micelas com diâmetros de aproximadamente 70 nm e com uma polidispersividade de aproximadamente 0.2. A carga superficial destas micelas foi medida em termos de potencial zeta obtido no Zeta Sizer NS, apresentando carga negativa (aproximadamente -4 mV). Estas micelas foram também analisadas por microscopia electrónica de varrimento com o objectivo de determinar a morfologia, apresentando uma forma esférica. Estas micelas evidenciaram grande estabilidade ao longo de cinco meses. Ensaios de



citotoxicidade revelaram que estas micelas proteicas apresentaram baixa citotoxicidade quando testadas em linhas celulares humanas (fibroblastos humanos- BJ5ta) . Micelas preparadas utilizando uma razão de BSA-FA/BSA de 1/100 demonstraram ter capacidade de ser internalizadas com mais eficiência por células com receptores de ácido fólico, quando comparadas com micelas sem ácido fólico à superfície .

#### **Efeito da composição no tamanho**

As formulações podem compreender diferentes razões fase aquosa/ fase lipofílica no homogeneizador , comparamos de seguida diversas razões

#### **Comparativo dos tamanhos**

|   | <b>Tamanho médio das micelas<br/>(nm)</b> |
|---|---|
| 90% solução aquosa de BSA a 1g/L / 10% óleo alimentar/ 0% do adjuvante    | 515.27                                    |
| 95% solução aquosa de BSA a 1g/L / 5% óleo alimentar/ 0% do adjuvante     | 317.94                                    |
| 99,5% solução aquosa de BSA a 1g/L / 0,5% óleo alimentar/ 0% do adjuvante | 249.65                                    |

#### **Análise do da concentração do poloxamer no tamanho**

Foram igualmente testadas diferentes concentrações de proteína, BSA, tendo-se observado que a utilização de maiores concentrações resultava em micelas menores. Sendo a concentração de 10g/L escolhida como sendo a concentração a utilizar na preparação desta composição proteica.

Utilizando esta concentração de proteína e a razão para a qual foram obtidas micelas de menores tamanhos, 99,5% v/v solução aquosa de BSA/ 0,5% v/v óleo alimentar procedeu-se à adição do copolímero, Poloxamer 407. Este copolímero é adicionado na fase aquosa, tendo sido testadas diferentes concentrações. A formulação escolhida como sendo a formulação óptima corresponde à composição proteica caracterizada por compreender:

- 99,5% da fase aquosa contendo BSA à concentração de 10g/L
- 0,5% da fase lipídica constituída por óleo alimentar;
- Poloxamer 407 (agente adjuvante) à concentração de 0,1-5g/L encontra-se presente na fase aquosa aquando da preparação da composição proteica.

Tabela 1: Comparação de tamanhos médios das micelas e polidispersividade das composições sem Poloxamer 407 e com duas concentrações deste copolímero.

|                              | Tamanho média das micelas (nm) | Polidispersividade |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| BSA/óleo                     | 233.57                         | 0.183              |
| BSA+Poloxamer<br>2,5g/L/óleo | 134.67                         | 0.110              |
| BSA+Poloxamer<br>5g/L/óleo   | 73.58                          | 0.184              |

### **Internalização em células - efeito da variação do poloxamer .**

As seguintes realizações contem o agente alvo -targeting: estas composições proteicas podem ainda conter opcionalmente um agente targeting de reconhecimento de determinadas células alvo. O agente de targeting utilizado foi o ácido fólico (FA) . Ensaio de internalização foram

realizados em células de cancro (CACO-2) bem como em macrófagos activados, células que expressam receptor de folato .

Tabela 2 : Percentagens de internalização de diferentes micelas .

|                                 | Células de cancro- CACO2 -<br>1,5 horas | Macrófagos activados<br>1 horas |
|---------------------------------|---|---------------------------------|
| BSA/óleo                        | 30%                                     | 75%                             |
| BSA/óleo+FA                     | 70%                                     | 95%                             |
| BSA+Poloxamer<br>2,5g/L/óleo    | 10%                                     | 40%                             |
| BSA+Poloxamer<br>2,5g/L/óleo+FA | 80%                                     | 80%                             |
| BSA+Poloxamer<br>5g/L/óleo      | 15%                                     | 15%                             |
| BSA+Poloxamer<br>5g/L/óleo+FA   | 85%                                     | 75%                             |

### Listagem de Peptidos

Tabela 3 - Construção peptídica com seis aminoácidos.

| Sequência peptídica (N-C terminal) |
|------------------------------------|
| SEQ ID NO: 1 - GAGAGS              |
| SEQ ID NO: 2 - GAGAGA              |
| SEQ ID NO: 3 - GAGSGS              |
| SEQ ID NO: 4 - GSGSGS              |
| SEQ ID NO: 5 - GAGAGL              |
| SEQ ID NO: 6 - GAGLGL              |
| SEQ ID NO: 7 - GLGLGL              |

|                        |
|------------------------|
| SEQ ID NO: 8 - GDGDGD  |
| SEQ ID NO: 9 - GAGAGD  |
| SEQ ID NO: 10 - GAGDGD |

Tabela 4 - Construção peptídica com diferente número de aminoácidos

|  |
|--|
| Sequência peptídica (N-C terminal)         |
| SEQ ID NO: 11 - DAAGAAAA                   |
| SEQ ID NO: 12 - DDAAGAAAA                  |
| SEQ ID NO: 13 - DDDAAGAAAA                 |
| SEQ ID NO: 14 - DDDDAAGAAAA                |
| SEQ ID NO: 15 - DAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAA    |
| SEQ ID NO: 16 - DDDDAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAA |

Tabela 5- Construção peptídica com vinte e dois aminoácidos

|   |
|---|
| Sequência peptídica<br>(N-C terminal)   |
| SEQ ID NO: 17 - ILLRKLHV PFFPIGFRGRPAAS |
| SEQ ID NO: 18 - ILLRKLHVPI IPIGIRGRPAAS |
| SEQ ID NO: 19 - ILLRKLHV PWWPIGWRGRPAAS |
| SEQ ID NO: 20 - ILLRKLHV PYYPIGYRGRPAAS |
| SEQ ID NO: 21 - ILLRKLHV AHGAIGIRGRPAAS |
| SEQ ID NO: 22 - ILLRKLHV CHGCIGIRGRPAAS |

Tabela 6 - Construção peptídica com catorze aminoácidos

|                                       |
|---------------------------------------|
| Sequência peptídica<br>(N-C terminal) |
| SEQ ID NO: 23 - KRCCPDTCGIKCLD        |
| SEQ ID NO: 24 - KRSSPDTSGIKSLD        |
| SEQ ID NO: 25 - KRYYPDTYGIKYLD        |
| SEQ ID NO: 26 - KRHPDTHGIKHL D        |
| SEQ ID NO: 27 - KRFFPDTFGIKFLD        |
| SEQ ID NO: 28 - KRLLPDTLGIKLLD        |

Tabela 7 - Poli (amino ácidos)

|                     |
|---------------------|
| Poli (amino ácidos) |
| Poli (Lisina)       |
| Poli (Serina)       |
| Poli (Prolina)      |
| Poli (Alanina)      |

## Referências

Addison, D. K., GB), Essler, Alicia J. (Skipton, GB), Cullen, Breda M. (Skipton, GB), Silcock, Derek W. (Skipton, GB) (2006). Wound treatment device. United States.

Brown, L. R. N., MA, US) (2004). Production of microspheres . United States.

Coombes, A. G. A. N., GB), Lin WU. (NOTTINGHAM, GB), O'hagen, Derek T. (BERKELEY, CA, US), Davis, Stanley s. (NOTTINGHAM, GB) (2002) . PREPARATION OF PROTEIN MICROSPHERES, FILMS AND COATINGS. United States.

Desai, N. P. L. A., CA), Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA), Sandford, Paul A. (Los Angeles, CA), Grinstaff, Mark W. (Pasadena, CA), Suslick, Kenneth s. (Champaign, IL) (1994) . Magnetic resonance imaging with fluorocarbons encapsulated in a cross-linked polymeric shell. United States, Vivorx Pharmaceuticals , Inc. (Santa Mónica, CA).

Desai, N. P. L. A., CA), Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA), Sandford, Paul A. (Los Angeles, CA), Grinstaff, Mark W. (Pasadena, CA), Suslick, Kenneth s. (Champaign, IL) (1995) . Methods for in vivo delivery of substantially water insoluble pharmacologically active agents and compositions useful therefor. United States, VivoRx Pharmaceuticals, Inc. (Santa Mónica, CA) .

Desai, N. P. L. A., CA), Tao, Chunlin (Beverly Hills, CA), Yang, Andrew (Rosemead, CA) , Louie, Leslie (Montebello, CA) , Zheng, Tianli (Culver City, CA) , Yao, Zhiwen (Culver City, CA) , Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA) , Magdassi, Shlomo (Jerusalém, IL) (1999). Protein stabilized

pharmacologically active agents, methods for the preparation thereof and methods for the use thereof. United States, Vivorx Pharmaceuticals, Inc. (Santa Mónica, CA).

Desai, N. P. L. A., CA, US), Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA, US) (2003). Methods and compositions useful for administration of chemotherapeutic agents. United States, American BioScience, Inc.

Di Salvo, A. B., NJ, US), Mordas, Carolyn J. (Lawrenceville, NJ, US), Nikolovski, Janeta (Princeton, NJ, US), Wiegand, Benjamin C. (Yardley, PA, US) (2008). ENZYME INHIBITION USING NANOPARTICLES. United States.

Disalvo, A. L. B., NJ, US), Mordas, Carolyn J. (Princeton, NJ, US) (2005). Absorbent articles comprising nanoparticles. United States.

Disalvo, A. L. B., NJ, US), Mordas, Carolyn J. (Princeton, NJ, US) (2005). Enhancing properties by the use of nanoparticles. United States.

Edwards, J. V., D. R. Yager, et al. (2001). "Modified cotton gauze dressings that selectively absorb neutrophil elastase activity in solution." Wound Repair and Regeneration 9(1): 50-58.

Gestrelus, S. L., SE), Hammarstrom, Lars (Djursholm, SE), Lyngstadaas, Petter (Nesoddtangen, NO), Andersson, Christer (Vellinge, SE), Slaby, Ivan (Malmo, SE), Hammargren, Tomas (Malmo, SE) (2003). Matrix protein compositions for treating infection. United States, Biora BioEx AB.

Grinstaff, M. W. and K. S. Suslick (1991). Polym. Prep. **32**: 255.

Grinstaff, M. W. P., CA), Desai, Neil P. (Los Angeles, CA), Suslick, Kenneth S. (Champaign, IL), Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA), Sandford, Paul A. (Los Angeles, CA), Merideth, Noma R. (Pacific Palisades, CA) (1996). Method for the preparation of fluorocarbon-containing polymeric shells for medical imaging. United States, Vivorx Pharmaceuticals, Inc. (Santa Mónica, CA).

Grinstaff, M. W. P., CA), Desai, Neil P. (Los Angeles, CA), Suslick, Kenneth S. (Champaign, IL), Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA), Sandford, Paul A. (Los Angeles, CA), Merideth, Noma R. (Pacific Palisades, CA) (1996). Non-fluorinated polymeric shells for medical imaging. United States, Vivorx Pharmaceuticals, Inc. (Santa Mónica, CA).

Grinstaff, M. W. P., CA), Desai, Neil P. (Los Angeles, CA), Suslick, Kenneth S. (Champaign, IL), Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA), Sandford, Paul A. (Los Angeles, CA), Merideth, Noma R. (Pacific Palisades, CA) (1996). Polymeric shells for medical imaging prepared from synthetic polymers, and methods for the use thereof. United States, Vivorx Pharmaceuticals, Inc. (Santa Mónica, CA).

Grinstaff, M. W. P., CA), Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA), Wong, Michael (Champaign, IL), Sandford, Paul A. (Los Angeles, CA), Suslick, Kenneth S. (Champaign, IL), Desai, Neil P. (Los Angeles, CA) (1997). Methods for in vivo delivery of nutraceuticals and compositions useful therefor. United States, Vivorx Pharmaceuticals, Inc. (Santa Mónica, CA).



Grinstaff, M. W. P., CA), Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA), Wong, Michael (Champagne, IL), Sandford, Paul A. (Los Angeles, CA), Suslick, Kenneth S. (Champagne, IL), Desai, Neil P. (Los Angeles, CA) (1997). Methods for the preparation of immunostimulating agents for in vivo delivery. United States, Vivorx Pharmaceuticals, Inc. (Santa Mónica, CA).

Grinstaff, M. W. P., CA), Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA), Wong, Michael (Champaign, IL), Sandford, Paul A. (Los Angeles, CA), Suslick, Kenneth S. (Champaign, IL), Desai, Neil P. (Los Angeles, CA) (1997). Methods for the preparation of blood substitutes for in vivo delivery. United States, Vivorx Pharmaceuticals, Inc. (Santa Mónica, CA).

Grinstaff, M. W. P., CA), Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA), Wong, Michael (Champaign, IL), Sandford, Paul A. (Los Angeles, CA), Suslick, Kenneth S. (Champaign, IL), Desai, Neil P. (Los Angeles, CA) (1997). Methods for the preparation of nucleic acids for in vivo delivery. United States, Vivorx Pharmaceuticals, Inc. (Santa Mónica, CA).

Grinstaff, M. W. P., CA), Soon-shiong, Patrick (Los Angeles, CA), Wong, Michael (Champaign, IL), Sandford, Paul A. (Los Angeles, CA), Suslick, Kenneth S. (Champaign, IL), Desai, Neil P. (Los Angeles, CA) (1997). Methods for the preparation of pharmaceutically active agents for in vivo delivery. United States, Vivorx Pharmaceuticals, Inc. (Santa Mónica, CA).

Mathiowitz, E. B., MA), Bernstein, Howard (Cambridge, MA), Morrei, Eric (Needham, MA), Schwaller, Kirsten (Duxbury, MA) (1993). Method for producing protein microspheres. United States, Alkermes Controlled Therapeutics, Inc. (Cambridge, MA) .

Oppenheim, R. C. P., AU), Marty, Jennifer Joy (East Kew, AU), Speiser, Peter (Zurich, CH) (1978). Injectable compositions, nanoparticles useful therein, and process of manufacturing same. United States, Pharmaceutical Society Of Victoria (Parkville, AU) .

Rippon, M. G. W., GB), Meadows, John (Wrexham, GB) (2006). Wound gels. United States, Maelor Pharmaceuticals Limited (Wrexham, GB) .

Royere, A. A., FR), Bazile, Didier (Angers, FR), Bibette, Jerome (Paris, FR) (2008). Method for Preparing Calibrated Biodegradable Microspheres. United States.

Senyei, A. E. C., IL), Widder, Kenneth J. (Chicago, IL) (1982). Method of incorporating water-soluble heat-sensitive therapeutic agents in albumin microspheres. United States, Northwestern University (Evanston, IL) .

Suslick, K. S. and M. W. Grinstaff (1990). "Protein Microencapsulation of Nonaqueous Liquids ." J. Am. Chem. Soc. (112) : 7807-7809.

Suslick, K. S. C., IL, US), Toublan, Farah Jean-jacques (Urbana, IL, US), Boppart, Stephen A. (Champaign, IL, US), Marks, Daniel L. (Urbana, IL, US) (2007). SURFACE MODIFIED PROTEIN MICROPARTICLES . United States.

Vassiliades, A. E. (1975). Microencapsulation System. United States, Champion International Corporation (New York, NY) .

Wille Jr., J. J. C , NJ, US) (2009). Wound healing compositions . United States.

Wulff, T. H., DK) , Aagren, Sven Per Magnus (Humlebaek, DK) , Nielsen, Peter Sylvest (Vaerloese, DK) (2001). Hydrocolloid wound gel. United States, Coloplast, A/s (Humlebaek, DK) .

Yager, D. R., S. M. Chen, et al. (1997). "Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors." Wound Repair and Regeneration 5(1): 23-32.

Yen, R. C. K. C. A., Los Angeles, CA, 90066) (1991). Manufacturing protein microspheres . United States.

Zolle, I. (1976). Method for incorporating substances into protein microspheres. United States (Lazarettgasse 14A, Vienna 1090, OE) .

A presente invenção não é, naturalmente, de modo algum restrito às realizações descritas neste documento e uma pessoa com conhecimentos médios da área poderá prever muitas possibilidades de modificação da mesma sem se afastar da ideia geral da invenção, tal como definido nas reivindicações.

As realizações preferenciais acima descritas são obviamente combináveis entre si. As seguintes reivindicações definem adicionalmente realizações preferenciais da presente invenção.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Formulação para a formação de micelas caracterizada por compreender :

- uma fase aquosa contendo uma proteína ou um péptido natural ou sintético;
- uma fase lipofílica que compreende um composto hidrofóbico ;
- um agente adjuvante dissolvido na fase aquosa que regula o tamanho e estabilidade das micelas;

em que os tamanhos das referidas micelas varia entre 30-5000 nm, de preferência de 30-100 nm.

2. Formulação de acordo com a reivindicação 1 caracterizada por

- 50-99,9 % v/v da fase aquosa a qual contem 0,1-8 g/l de um agente adjuvante dissolvido, de preferência de 2-6 g/L;
- 0,1-50 % v/v uma fase lipofílica.

3. Formulação de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizada por a fase aquosa estar compreendida por uma das seguintes soluções:

- albumina sérica bovina (BSA) ;
- albumina sérica humana (HSA) ;
- fibroína da seda;
- um polipéptido N-C terminal seis aminoácidos SEQ ID NO: 1 - GAGAGS; GAGAGA; GAGSGS; GSGSGS; GAGAGL; GAGLGL; GLGLGL; GDGDGD; GAGAGD; GAGDGD;
- ou péptidos com diferentes aminoácidos DAAGAAAA; DDAAGAAAA; DDDAAGAAAA; DDDDAAGAAAA;

DAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAA ;  
 DDDDAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAA ;

- péptidos com vinte e dois aminoácidos  
 ILLRKLHVFFPIGFRGRPAAS; ILLRKLHVPI IPIGIRGRPAAS ;  
 ILLRKLHVPWWPIGWRGRPAAS ; ILLRKLHVPPYPIGYRGRPAAS ;  
 ILLRKLHVAHGAIGIRGRPAAS ; ILLRKLHVCHGCIGIRGRPAAS ;
- péptidos com catorze aminoácidos; KRCCPDTCGIKCLD;  
 KRSSPDTSGIKSLD; KRYYPDTYGIKYLD; KRHPDTHGIKHL D;  
 KRFFPDFTGIKFLD; KRLLPDTLGIKLLD .

4. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizada por opcionalmente conter um composto ativo hidrofílico.
5. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizada por, a fase lipofílica conter um composto hidrofóbico 0,1-50% v/v da fase lipofílica.
6. Formulação de acordo com a reivindicações anteriores caracterizada por o composto ativo hidrofílico ser diclonofenac, piroxicam.
7. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada por conter ainda um agente alvo, de reconhecimento de determinadas células, na fase aquosa ou fase lipofílica .
8. Formulação de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por opcionalmente o agente targeting ser ácido fólico .

9. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada a fase lipofílica compreender uma das seguintes soluções o n-dodecano; óleo vegetal ou óleo alimentar.
10. Formulação de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por a referida fase lipofílica conter ainda pelo menos um composto ativo hidrofóbico, seleccionado do seguinte grupo taxol, celecoxib, piroxicam, CORMs .
11. Formulação de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por a referida fase lipofílica conter ainda pelo menos um composto seleccionado do seguinte grupo fragâncias, perfumes, ou óleos essenciais .
12. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada por o agente adjuvante ser um surfactante ou um polímero.
13. Formulação de acordo com a reivindicação anteriores, caracterizada por o agente adjuvante ser seleccionado do seguinte grupo polisorbato 80; poloxamer 407; dodecil sulfato de sódio; álcool polivinílico ou ácido plurónico.
14. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada por:
- a fase aquosa compreender uma solução de albumina ;
  - a fase lipofílica compreender um óleo vegetal;

- o agente adjuvante ser poloxamer.
15. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo uso em medicina, ou como cosmético, ou como detergente.
  16. Método de preparação da formulação conforme descrita nas reivindicações 1 a 15, caracterizada por utilizar um aparelho de ultra-sons ou um homogeneizador de alta pressão.
  17. Composições farmacêuticas caracterizadas por conter as formulações descritas nas reivindicações 1-14.
  18. Composições farmacêuticas caracterizadas por serem ministradas por via tópica, oral, parental, injectável, nomeadamente para aplicação intravenosa, subcutânea e intramuscular.
  19. Composições cosméticas caracterizadas por conter as formulações descritas nas reivindicações 1-15.
  20. Composições cosméticas de acordo com a reivindicação anterior caracterizadas por terem a forma de creme, loção ou gel.
  21. Composições cosméticas de acordo com a reivindicação anterior caracterizadas por serem usadas no tratamento de problemas de pele ou cabelo.

22. Composições de detergentes sólidos ou líquidos caracterizados por conterem a formulação descrita nas reivindicações 1-15.



RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional N°

PCT/IB2012/G57082

| <p>A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO</p> <p>A61K9/107      A61K47/42      A61K47/18      A61K31/54      A61K8/06</p> <p>A61Q19/00      A61Q5/00      C11D1/00</p> <p>De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC</p>  |   |  |                        |   |                                     |   |   |               |   |  |   |   |   |                              |
|---|---|--|------------------------|---|-------------------------------------|---|---|---------------|---|--|---|---|---|------------------------------|
| <p>B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA</p> <p>Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)</p> <p>A61K</p> <p>Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados</p> <p>Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)</p>  |   |  |                        |   |                                     |   |   |               |   |  |   |   |   |                              |
| <p>C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Categoria<sup>*</sup></th> <th>Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado</th> <th>Relevante para as reivindicações N°</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2005/009731 A1 (DESAI NEIL P [US] ET AL) <b>13 Janeiro 2005 (2005-01-13)</b></td> <td>1-5, 7-18, 22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td><b>parágrafos [0027], [0028], [0033] - [0035]; exemplos 3, 7</b></td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>-----<br/>WO 2007/110421 A2 (NESTEC SA [CH] ; SCHMITT CHRISTOPHE JOSEPH ETIE [CH] ; BOVETTO LIONEL JE) <b>04 Outubro 2007 (2007-10-04)</b><br/><b>página 23, último parágrafo; exemplos 6</b><br/>-----<br/>- / . .</td> <td>1, 2, 4, 5, 9, 11, 16, 19-21</td> </tr> </tbody> </table>  |   |  | Categoria <sup>*</sup> | Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado | Relevante para as reivindicações N° | X | US 2005/009731 A1 (DESAI NEIL P [US] ET AL) <b>13 Janeiro 2005 (2005-01-13)</b> | 1-5, 7-18, 22 | Y | <b>parágrafos [0027], [0028], [0033] - [0035]; exemplos 3, 7</b> | 3 | X | -----<br>WO 2007/110421 A2 (NESTEC SA [CH] ; SCHMITT CHRISTOPHE JOSEPH ETIE [CH] ; BOVETTO LIONEL JE) <b>04 Outubro 2007 (2007-10-04)</b><br><b>página 23, último parágrafo; exemplos 6</b><br>-----<br>- / . . | 1, 2, 4, 5, 9, 11, 16, 19-21 |
| Categoria <sup>*</sup>  | Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado   | Relevante para as reivindicações N°  |                        |   |                                     |   |   |               |   |  |   |   |   |                              |
| X   | US 2005/009731 A1 (DESAI NEIL P [US] ET AL) <b>13 Janeiro 2005 (2005-01-13)</b>   | 1-5, 7-18, 22  |                        |   |                                     |   |   |               |   |  |   |   |   |                              |
| Y   | <b>parágrafos [0027], [0028], [0033] - [0035]; exemplos 3, 7</b>  | 3  |                        |   |                                     |   |   |               |   |  |   |   |   |                              |
| X   | -----<br>WO 2007/110421 A2 (NESTEC SA [CH] ; SCHMITT CHRISTOPHE JOSEPH ETIE [CH] ; BOVETTO LIONEL JE) <b>04 Outubro 2007 (2007-10-04)</b><br><b>página 23, último parágrafo; exemplos 6</b><br>-----<br>- / . . | 1, 2, 4, 5, 9, 11, 16, 19-21   |                        |   |                                     |   |   |               |   |  |   |   |   |                              |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> Documentos adicionais estão listados na continuação do Quadro C      <input type="checkbox"/> Ver o anexo de família da patentes</p>   |   |  |                        |   |                                     |   |   |               |   |  |   |   |   |                              |
| <p>* Categorias especiais dos documentos citados:</p> <p>"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.      "T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita com o depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.</p> <p>"E" depósito ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional.      "X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.</p> <p>"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial (como especificado).      "Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.</p> <p>"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.      "&amp;" documento membro da mesma família de patentes.</p> <p>"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.</p> |   |  |                        |   |                                     |   |   |               |   |  |   |   |   |                              |
| <p>Data da conclusão da pesquisa internacional</p> <p>12 April 2013</p>   |   | <p>Data do envio do relatório de pesquisa internacional:</p> <p>23/04/2013</p> |                        |   |                                     |   |   |               |   |  |   |   |   |                              |
| <p>Nome e endereço da ISA/ <b>EP</b></p>  |   | <p>Funcionário autorizado</p>  |                        |   |                                     |   |   |               |   |  |   |   |   |                              |
| <p>N° de fax:</p>   |   | <p>N° de telefone:</p>   |                        |   |                                     |   |   |               |   |  |   |   |   |                              |

| Categoria* | Citação do documento com indicação de partes relevantes, quando apropriado   | Relevante para as reivindicações N° |
|------------|--|-------------------------------------|
| Y          | SILVA RAQUEL ET AL: "Sonoproduction of liposomes and protein particles as templates for delivery purposes.", BIOMACROMOLECULES 10 OCT 2011, vol. 12, no. 10, <b>10 Outubro 2011 (2011-10-10), páginas 3353-3368, XP002694894, ISSN: 1526-4602</b><br><b>página 3358, à direita coluna, parágrafo 4;</b><br><b>- página 3362, à direita coluna, último parágrafo</b>  | 1-7, 9-21                           |
| Y          | -----<br>GRINBERG ET AL: "Characterization and activity of sonochemically-prepared BSA microspheres containing Taxol - An anti cancer drug", ULTRASONICS: SONOCHEMISTRY, BUTTERWORTH-HEINEMANN, GB, vol. 14, no. 5, <b>27 Abril 2007 (2007-04-27), páginas 661-666, XPO22050735, ISSN: 1350-4177, DOI: 10.1016/J.ULTSONCH.2006.11.004</b><br><b>todo o documento</b>   | 1-6,<br>9-13,<br>15-18              |
| Y          | -----<br>HYOUNG-JOON JIN ET AL: "Mechanism of silk processing in insects and spiders", NATURE, vol. 424, no. 6952, <b>28 Agosto 2003 (2003-08-28), páginas 1057-1061, XP055058447, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature01809</b><br><b>página 1057, à esquerda coluna, último parágrafo - à direita coluna, parágrafo 2 página 1058, à direita coluna, parágrafo 2; figura 2</b><br><b>página 1059; figura 3</b><br><b>página 1060, à esquerda coluna, parágrafo 2; figura 4</b><br><b>página 1060, à direita coluna, último parágrafo</b> | 3                                   |
| X, P       | -----<br>RAQUEL SILVA ET AL: "Protein microspheres as suitable devices for protein release", COLLOIDS AND SURFACES. B, BIOINTERFACES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 92, <b>8 Dezembro 2011 (2011-12-08), páginas 277-285, XP028448522, ISSN: 0927-7765, DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2011.11.050</b><br><b>[retrieved on 2011-12-08]</b><br><b>todo o documento</b>   | 1-6,<br>9-13,<br>15-18              |

-/--

| Categoria* | Citação do documento com indicação de partes relevantes, quando apropriado  | Relevante para as reivindicações N° |
|------------|---|-------------------------------------|
| Y, P       | <p>RAQUEL SILVA ET AL: "Insights on the Mechanism of Formation of Protein Microspheres in a Biphasic System" , MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol . 9, no. 11, <b>5 November 2012 (2012-11-05), páginas</b> ; 3079-3088, XP055058584, ISSN: 1543-8384, DOI : 10. 1021/mp3001827</p> <p><b>todo o documento</b></p> <p>-----</p> | I - 5,7 ,9,<br>II- 21               |

**RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL**  
Informação reialiva a membros da família da patentes

Depósito internacional N°  
**PCT/IB2012/057Q82**

|       |            |    |            |    |            |    |              |
|-------|------------|----|------------|----|------------|----|--------------|
| US    | 2005009731 | AI | 13-01-2005 | US | 2005009731 | AI | 13-01--2005  |
|       |            |    |            | Wo | 2005007131 | A2 | 27--01--2005 |
| ----- |            |    |            |    |            |    |              |
| Wo    | 2007110421 | A2 | 04-10-2007 | AR | 060163     | AI | 28--05--2008 |
|       |            |    |            | AT | 524073     | T  | 15--09--2011 |
|       |            |    |            | AU | 2007231336 | AI | 04--10--2007 |
|       |            |    |            | AU | 2007231346 | AI | 04--10--2007 |
|       |            |    |            | CA | 2640684    | AI | 04--10--2007 |
|       |            |    |            | CA | 2643651    | AI | 04--10--2007 |
|       |            |    |            | CN | 101410020  | A  | 15--04--2009 |
|       |            |    |            | CN | 101410025  | A  | 15--04--2009 |
|       |            |    |            | EP | 1839492    | AI | 03--10--2007 |
|       |            |    |            | EP | 1998626    | A2 | 10--12--2008 |
|       |            |    |            | EP | 2001306    | A2 | 17--12--2008 |
|       |            |    |            | ES | 2373400    | T3 | 03--02--2012 |
|       |            |    |            | JP | 2009531043 | A  | 03--09--2009 |
|       |            |    |            | NZ | 571141     | A  | 25--11--2011 |
|       |            |    |            | PL | 1839492    | T3 | 29--02--2012 |
|       |            |    |            | RU | 2008142396 | A  | 10--05--2010 |
|       |            |    |            | RU | 2008142397 | A  | 10--05--2010 |
|       |            |    |            | US | 2009035437 | AI | 05--02--2009 |
|       |            |    |            | Wo | 2007110411 | A2 | 04--10--2007 |
|       |            |    |            | Wo | 2007110421 | A2 | 04--10--2007 |
|       |            |    |            | ZA | 200809154  | A  | 27--01--2010 |
| ----- |            |    |            |    |            |    |              |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/IB2012/057082 |
|---|

|   |  |                                 |  |  |
|---|--|---------------------------------|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. A61K9/107 A61K47/42 A61K47/18 A61K31/54 A61K8/06<br>A61Q19/00 A61Q5/00 C11D1/00<br>ADD.<br>According to International Patent Classification (IPC) onto both national classification and IPC  |  |                                 |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>A61K<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>EPO-Internal , WPI Data, BIOSIS, EMBASE  |  |                                 |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |  |                                 |  |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.           |  |  |
| X   | us 2005/009731 AI (DESAI NEIL P [US] ET AL) 13 January 2005 (2005-01-13)   | 1-5,<br>7-18,22                 |  |  |
| Y   | paragraphs [0027] , [0028] , [0033] - [0035] ; examples 3, 7<br>-----  | 3                               |  |  |
| X   | Wo 2007/110421 A2 (NESTEC SA [CH] ; SCHMITT CHRISTOPHE JOSEPH ETI E [CH] ; BOVETTO LIONEL JE) 4 October 2007 (2007-10-04) page 23, last paragraph; example 6<br>-----<br>- / - -   | 1,2,4,5,<br>9, 11, 16,<br>19-21 |  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <span style="margin-left: 100px;"><input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</span>  |  |                                 |  |  |
| * Special categories of cited documents :<br><table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;">                     "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br/>                     "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br/>                     "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br/>                     "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br/>                     "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                 </td> <td style="width: 50%; border: none;">                     "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br/>                     "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br/>                     "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br/>                     "&amp;" document member of the same patent family                 </td> </tr> </table> |  |                                 | "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                 |  |  |
| Date of the actual completion of the international search   | Date of mailing of the international search report   |                                 |  |  |
| 12 April 2013   | 23/04/2013   |                                 |  |  |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016  | Authorized officer<br><br>Martijn , Emmeline   |                                 |  |  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/057082

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                        |
|--|--|------------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| Y  | <p>SILVA RAQUEL ET AL: "Sonoproduction of liposomes and protein particles as templates for delivery purposes.", BIOMACROMOLECULES 10 OCT 2011, vol. 12, no. 10, 10 October 2011 (2011-10-10), pages 3353-3368, XP002694894, ISSN: 1526-4602<br/>page 3358, right-hand column, paragraph 4 - page 3362, right-hand column, last paragraph</p> <p>-----</p>  | 1-7,9-21               |
| Y  | <p>GRINBERG ET AL: "Characterization and activity of sonochemically-prepared BSA microspheres containing Taxol - An anticancer drug", ULTRASONICS: SONOCHEMISTRY, BUTTERWORTH-HEINEMANN, GB, vol. 14, no. 5, 27 April 2007 (2007-04-27), pages 661-666, XP022050735, ISSN: 1350-4177, DOI: 10.1016/J.ULTSONCH.2006.11.004<br/>the whole document</p> <p>-----</p>  | 1-6,<br>9-13,<br>15-18 |
| Y  | <p>HYOUNG-JOON JIN ET AL: "Mechanism of silk processing in insects and spiders", NATURE, vol. 424, no. 6952, 28 August 2003 (2003-08-28), pages 1057-1061, XP055058447, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature01809<br/>page 1057, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 2;<br/>page 1058, right-hand column, paragraph 2;<br/>figure 2<br/>page 1059; figure 3<br/>page 1060, left-hand column, paragraph 2;<br/>figure 4<br/>page 1060, right-hand column, last paragraph</p> <p>-----</p> | 3                      |
| X, P   | <p>RAQUEL SILVA ET AL: "Protein microspheres as suitable devices for proxi cam release", COLLOIDS AND SURFACES. B, BIOINTERFACES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 92, 8 December 2011 (2011-12-08), pages 277-285, XP028448522, ISSN: 0927-7765, DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2011.11.050<br/>[retrieved on 2011-12-08]<br/>the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">- / - -</p>  | 1-6,<br>9-13,<br>15-18 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/IB2012/057082

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.          |
|-----------|--|--------------------------------|
| Y, P      | <p>RAQUEL SILVA ET AL: "Insights on the Mechanism of Formation of Protein Microspheres in a Biphasic System" , MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol . 9, no. 11, 5 November 2012 (2012-11-05) , pages 3079-3088, XP055058584, ISSN: 1543-8384, DOI : 10. 1021/mp3001827 the whole document</p> <p align="center">-----</p> | <p>I -5,7 ,9, ,<br/>II- 21</p> |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/IB2012/057082 |
|---|

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| US 2005009731 AI                       | 13-01-2005       | US 2005009731 AI        | 13-01--2005      |
|  |                  | wo 2005007131 A2        | 27-01--2005      |
| -----                                  |                  |                         |                  |
| wo 2007110421 A2                       | 04-10-2007       | AR 060163 AI            | 28--05--2008     |
|  |                  | AT 524073 T             | 15--09--2011     |
|  |                  | AU 2007231336 AI        | 04--10--2007     |
|  |                  | AU 2007231346 AI        | 04--10--2007     |
|  |                  | CA 2640684 AI           | 04--10--2007     |
|  |                  | CA 2643651 AI           | 04--10--2007     |
|  |                  | CN 101410020 A          | 15--04--2009     |
|  |                  | CN 101410025 A          | 15--04--2009     |
|  |                  | EP 1839492 AI           | 03--10--2007     |
|  |                  | EP 1998626 A2           | 10--12--2008     |
|  |                  | EP 2001306 A2           | 17--12--2008     |
|  |                  | ES 2373400 T3           | 03--02--2012     |
|  |                  | JP 2009531043 A         | 03--09--2009     |
|  |                  | NZ 571141 A             | 25--11--2011     |
|  |                  | PL 1839492 T3           | 29--02--2012     |
|  |                  | RU 2008142396 A         | 10--05--2010     |
|  |                  | RU 2008142397 A         | 10--05--2010     |
|  |                  | US 2009035437 AI        | 05--02--2009     |
|  |                  | wo 2007110411 A2        | 04--10--2007     |
|  |                  | wo 2007110421 A2        | 04--10--2007     |
|  |                  | ZA 200809154 A          | 27--01--2010     |
| -----                                  |                  |                         |                  |