

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

(21) **PI0608635-7 A2**



(22) Data de Depósito: 14/03/2006
(43) Data da Publicação: 19/01/2010
(RPI 2037)

(51) Int.Cl.:

A61K 9/51 (2010.01)
A61K 9/16 (2010.01)
A61K 47/30 (2010.01)
C08G 63/91 (2010.01)
C08B 37/08 (2010.01)

(54) Título: **NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E POLIETILENOGLICOL COMO SISTEMA DE ADMINISTRAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOLOGICAMENTE ATIVAS**

(30) Prioridade Unionista: 14/03/2005 ES P200500590

(73) Titular(es): Advanced In Vitro Cell Technologies, S.L

(72) Inventor(es): Kevin Janes, Maria José Alonso Fernández, Noemi Csaba

(74) Procurador(es): Magnus Aspeby/Claudio Marcelo Szabas

(86) Pedido Internacional: PCT ES2006000123 de 14/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/097558 de 21/09/2006

(57) Resumo: NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E POLIETILENOGLICOL COMO SISTEMA DE ADMINISTRAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOLOGICAMENTE ATIVAS. A invenção refere-se a sistemas nanoparticulados para a liberação de moléculas biologicamente ativas compreendendo polímero quitosana ou seus derivados, modificado quimicamente com polietilenoglicol e reticulado com um agente de reticulação. Estes sistemas são especialmente úteis para composições farmacêuticas, vacinas e formulações cosméticas.

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E POLIETILENOGLICOL COMO
SISTEMA DE ADMINISTRAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAMENTE ATIVAS**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A invenção refere-se a sistemas nanoparticulados para a liberação de moléculas biologicamente ativas. Em particular refere-se a sistemas nanoparticulados, constituídos por um conjugado de quitosana-polietilenoglicol reticulado de forma iônica no qual se
10 pode localizar uma molécula biologicamente ativa, bem como a procedimentos para sua obtenção.

ESTADO DA TÉCNICA

15 Os sistemas para a liberação de agentes biologicamente ativos constituem um campo de investigação em contínuo desenvolvimento. Sabe-se que a administração de ingredientes ativos ao corpo humano e animal por diferentes vias de administração apresenta dificuldades. Alguns fármacos, entre os quais se encontram peptídeos, proteínas
20 e polissacarídeos não são absorvidos de maneira efetiva através de superfícies mucosas tendo em vista a permeabilidade limitada das barreiras epiteliais. Por exemplo a insulina, cuja administração atualmente é por via subcutânea e portanto não interessante para o paciente, é
25 um desses ingredientes ativos com uma capacidade pobre para atravessar barreiras mucosas como a nasal ou a intestinal, que torna necessário o desenvolvimento de sistemas de administração que permitam uma melhor absorção desta molécula ativa caso se deseje encontrar vias alternativas à
30 a subcutânea.

Dentro das possibilidades propostas recentemente para superar as barreiras biológicas que enfrentam os fármacos, destaca-se a incorporação dos ingredientes ativos em partículas de pequeno tamanho. A interação das ditas
5 partículas com as mucosas é afetada, entre outros fatores, pelo tamanho destas partículas, aumentando a dita interação com a diminuição do tamanho das partículas.

Desta forma, o pedido de patente US 2004/138095 descreve uma suspensão aquosa de nanopartículas para a
10 liberação de insulina, entre outros princípios ativos, baseada em copolímeros tri-bloco polietileno-glicol/poli-aminoácido hidrofílico/poli-aminoácido hidrofóbico. Por outro lado, a patente US 5.641.515 descreve uma formulação farmacêutica para a liberação controlada de
15 insulina que compreende nanopartículas formadas por policianoacrilato biodegradável no qual a insulina é fixada formando um complexo.

Da mesma forma, foram desenvolvidos sistemas nanoparticulados a base de polímeros hidrofílicos para
20 aplicação como sistemas de liberação de fármacos. Assim o mostra a literatura abundante existente neste campo. Foram publicados numerosos trabalhos que descrevem diversos métodos de elaboração de nanopartículas hidrofílicas a base de macromoléculas de origem natural como são as
25 nanopartículas de albumina (W. Lin et al., Pharm. Res., 11, 1994) e gelatina (H.J. Watzke et al., Adv. Colloid Interface Sci., 50, 1-14, 1994) e a base de polissacarídeos como o alginato (M. Rajaonarivony et al., J. Pharm. Sci., 82, 912-7, 1993). Entretanto a maioria destes métodos
30 requer a utilização de solventes orgânicos, óleos e

temperaturas elevadas, aspectos que limitam enormemente a exploração destes sistemas. Entre estes métodos, o mais inócuo foi o proposto para a elaboração de nanopartículas de alginato, baseado em um processo de gelificação iônica na presença de cálcio e posterior endurecimento na presença do polieletrólito catiônico poli-L-lisina. Estas nanopartículas apresentam entretanto os problemas relativos à toxidez sistêmica e o custo elevado da poli-L-lisina.

Uma alternativa a estes sistemas foi o desenvolvimento de nanopartículas de quitosana, existindo no estado da técnica publicações que descrevem sua utilidade na administração de ingredientes ativos assim como o procedimento de sua obtenção (J. Appl. Polym. Sci. 1997, 63, 125-132; Pharm. Res. 14, 1997b, 1431-6; Pharm. Res. 16, 1991a, 1576-81; S.T.P. Pharm. Sci. 9, 1999b, 429-36, Pharm. Res. 16, 1999, 1830-5; J. Control Release 74, 2001, 317-23 e US 5.843.509). Estas nanopartículas apresentam o inconveniente de sua estabilidade limitada em determinadas condições de pH e força iônica.

O documento WO-A-01/32751 se refere a um procedimento para a preparação de quitosanas ou derivados de quitosana na forma de nanopartículas, consistindo na dissolução da quitosana ou derivados em um meio aquoso e elevando-se posteriormente o pH na presença de um agente modificador de superfície, até que se chegue à precipitação da quitosana.

O documento WO-A-99/47130 se refere a nanopartículas que apresentam um complexo de polieletrólito biocompatível e biodegradável, a partir de pelo menos um polycation (que pode ser a quitosana) e pelo menos um poliânion, como um ingrediente ativo, sendo as nanopartículas obteníveis

tratando-se adicionalmente o complexo de polieletrólito durante o depois de sua formação com pelo menos um agente de reticulação (glioxal, TSTU ou EDAP).

É conhecida também a obtenção de nanopartículas de quitosana em combinação com polioxietileno (ES 2098188 e ES 2114502), além do ingrediente ativo que pode ser uma macromolécula terapêutica ou antigênica. A formação destas nanopartículas ocorre devido a um processo de precipitação conjunta da quitosana e da macromolécula ativa na forma de nanoagregados poliméricos, causado pela adição de um agente de caráter básico como é o caso do tripolifosfato.

Por outro lado, a quitosana pode ser modificada pela união covalente com polietilenoglicol através da função amino, o que se conhece como processo de peguilação. As patentes EP 1304346 e US 6.730.735 descrevem uma composição para a administração de fármacos por vias mucosas que compreende um conjugado de quitosana e PEG, estando ambos unidos covalentemente através do grupo amino da quitosana.

O pedido de patente US 2004/0156904 descreve um sistema de liberação de agentes farmacêuticos, no qual o agente ativo se incorpora a uma matriz preparada a partir de uma composição que inclui quitosana-PEG e um polímero insolúvel em água como o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).

O pedido de patente WO 01/32751 descreve a obtenção de nanopartículas de quitosana que se precipitam na presença de um tensoativo, entre eles o polietilenoglicol, pelo aumento do pH da solução em que se encontram. Entretanto, o PEG no se liga covalentemente à quitosana.

Apesar das numerosas publicações dirigidas ao desenvolvimento de sistemas para a liberação de fármacos, ainda existe uma necessidade de se prover um tipo de sistema nanoparticulado que apresente uma grande capacidade de associação com uma molécula biologicamente ativa e que permita sua liberação a uma velocidade controlada.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Os inventores observaram que um sistema constituído por nanopartículas de quitosana modificada com PEG obtidas por um procedimento de gelificação iônica na presença de um agente que provoca a reticulação da quitosana, permite uma eficaz associação de moléculas biologicamente ativas bem como sua posterior liberação em um ambiente biológico adequado. As nanopartículas de quitosana modificada com PEG apresentam propriedades notáveis em relação às nanopartículas de quitosana sem PEG, por exemplo na administração nasal de insulina ou na imunogenicidade como resposta à administração nasal de toxóide diftérico.

Desta forma, um objeto da presente invenção refere-se a um sistema que compreende nanopartículas para a liberação de uma molécula biologicamente ativa, onde as nanopartículas compreendem um conjugado que compreende a) pelo menos 50% em peso de quitosana ou um derivado deste e b) menos de 50% em peso de polietilenoglicol (PEG) ou um derivado deste, onde ambos os componentes a) e b) estão ligados covalentemente através dos grupos amino da quitosana, e caracterizado pelo fato das ditas nanopartículas se encontrarem reticuladas por meio mediante um agente de reticulação.

A expressão "molécula biologicamente ativa" tem um sentido amplo e compreende moléculas tais como fármacos de baixo peso molecular, polissacarídeos, proteínas, peptídeos, lipídeos, oligonucleotídeos e ácidos nucleicos e
5 combinações destes. Em uma variante da invenção a molécula biologicamente ativa tem como função prevenir, aliviar, curar ou diagnosticar enfermidades. Em outra variante da invenção a molécula biologicamente ativa tem uma função cosmética.

10 Um segundo aspecto da presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica ou vacina que compreende as nanopartículas definidas anteriormente. Em um aspecto preferível, a composição ou vacina é para administração por via mucosa.

15 Em outro aspecto, a invenção se dirige a uma composição cosmética que compreende as nanopartículas definidas anteriormente.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a uma composição que compreende as nanopartículas de quitosana-
20 PEG em cujo seio pode estar retida uma ou mais moléculas biologicamente ativas que pode ser um fármaco, uma vacina, ou um material genético. Da mesma forma, se podem encontrar contidos na nanoestrutura peptídeos, proteínas ou polissacarídeos que não sejam considerados moléculas
25 biológicas ativas "per se", mas que podem contribuir para a eficácia do sistema de administração.

Um último aspecto da invenção refere-se a um procedimento de obtenção de um sistema para a liberação de uma molécula biologicamente ativa tal como definido, que
30 compreende:

a) preparação de uma solução aquosa do conjugado quitosana-PEG;

b) preparação de uma solução aquosa do agente de reticulação; e

5 c) mistura, sob agitação, das soluções obtidas nas etapas a) e b), de modo que se obtêm espontaneamente as nanopartículas de quitosana-PEG mediante gelificação iônica e conseqüente precipitação.

10 Em uma variante do procedimento o ingrediente ativo é bem incorporado na solução aquosa da quitosana ou à solução aquosa do agente de reticulação, antes de mistura de ambas as fases.

15 **DESCRIÇÃO DETALHADA DOS DESENHOS**

Figura 1A: Efeito do grau de peguilação da quitosana, do pH da solução do polímero e da relação quitosana-PEG/TTP sobre o tamanho das nanopartículas.

Figura 1B: Efeito do grau de peguilação da quitosana, 20 do pH da solução do polímero e da relação quitosana-PEG/TTP sobre a polidispersão sobre o tamanho das nanopartículas.

Figura 2A: Análise de eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial associado a nanopartículas de quitosana e quitosana-PEG depois de 1 dia de incubação em tampão 25 acetato (pH: 4 e 7,4) e em água purificada (MQ).

Figura 2B: Análise de eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial associado a nanopartículas de quitosana e quitosana-PEG depois de 4 semanas de incubação em tampão acetato (pH: 4 e 7,4) e em água purificada (MQ).

Figura 3: Análise de eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial associado a nanopartículas de quitosana e quitosana-PEG na presença de quitosanase.

Figura 4A: Efeito do grau de peguilação sobre a
5 eficácia na transfecção de nanopartículas de quitosana (CS) de alto peso molecular.

Figura 4B: Efeito da carga de pDNA sobre a eficácia na transfecção de nanopartículas de quitosana (CS) de alto peso molecular.

10 **Figura 5A:** Efeito da carga de pDNA sobre a eficácia na transfecção de nanopartículas de quitosana (CS) de baixo peso molecular.

Figura 5B: Efeito do grau de peguilação sobre a
15 eficácia na transfecção de nanopartículas de quitosana (CS) de baixo peso molecular.

Figura 6: Glicemia depois da administração intranasal de 10 U/kg de insulina contida em diferentes formulações ou tampão acetato (controle). A glicemia é expressada em % em relação aos valores de base, em valor médio $\pm$ S.E.M. Os
20 valores de base antes das administrações diferentes são os seguintes: tampão acetato (■): 423 ± 16 mg/dl (n=7); insulina (□): 430 ± 15 mg/dl (n=7); insulina em solução de quitosana (●): 439 ± 12 mg/dl (n=8); nanopartículas de quitosana (◆): 469 ± 14 mg/dl (n=7); nanopartículas de quitosana-PEG (○):
25 458 ± 21 mg/dl (n=8).

Figura 7: Testes de tolerância à glicose realizados depois da administração intranasal das formulações que contêm insulina ou tampão acetato em fêmeas de rato diabéticas submetidas a jejum durante a noite. A glicose
30 (2 g por kg de massa corporal) foi administrada por via

intra-gástrica no tempo 0 e uma hora depois das administrações intranasais: tampão acetato (■) (n=10); insulina (□) (n=6); insulina em solução de quitosana (●) (n=6); nanopartículas de quitosana (◆) (n=6);
 5 nanopartículas de quitosana-PEG (○) (n=6).

Figura 8: Títulos finais de IgG anti-TD em soro de rato depois da administração intranasal de 10 µg de TD incorporado em diferentes formulações de nanopartículas de quitosana e quitosana-PEG nos dias 0, 7 e 14 (n=6). IN:
 10 Intranasal; IP: Intraperitoneal.

* Diferenças estatisticamente significativas ($\alpha < 0,5$).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O sistema da presente invenção compreende
 15 nanopartículas, cuja estrutura compreende um conjugado reticulado de quitosana e polietilenoglicol (PEG), na qual se pode incorporar um ingrediente ativo.

Pelo termo "nanopartícula" se entende uma estrutura que compreende um conjugado, resultante da ligação
 20 covalente entre a quitosana e o PEG através dos grupos amino da quitosana, o qual além disto se encontra reticulado mediante gelificação iônica pela ação de um agente de reticulação de caráter aniônico. A formação das ligações covalentes e a conseqüente reticulação iônica do
 25 sistema gera entidades físicas características, independentes e observáveis, cujo tamanho médio é inferior a 1 µm, isto é, um tamanho médio compreendido entre 1 e 999 nm.

Por "tamanho médio" se entende o diâmetro médio da
 30 população de nanopartículas que se deslocam em conjunto no

meio aquoso no qual se formam. O tamanho médio destes sistemas se pode determinar mediante procedimentos padrão conhecidos do especialista na técnica, e que são descritos, por exemplo, na parte experimental abaixo.

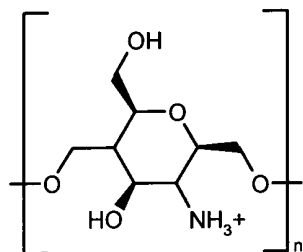
5 As nanopartículas do sistema se caracterizam pelo fato de apresentarem um tamanho médio de partículas inferior a 1 μm , preferivelmente apresentam um tamanho médio compreendido entre 1999 nm, preferivelmente entre 50 e 800 nm, e ainda mais preferivelmente entre 50 nm e 500
10 nm. O tamanho médio das partículas é influenciado principalmente pela proporção de quitosana em relação ao PEG, pelo grau de desacetilação da quitosana e também pelas condições de formação das partículas (concentração de quitosana-PEG, concentração de agente de reticulação e
15 relação entre ambos). A presença do PEG reduz o tamanho médio das partículas em relação a sistemas formados por quitosana sem PEG.

Por outro lado, as nanopartículas podem apresentar uma carga elétrica (medida pelo potencial Z), cuja
20 magnitude pode variar de +0,1 mV a +50 mV, preferivelmente entre +1 e +40 mV, dependendo das variáveis mencionadas e de forma particular do grau de funcionalização da quitosana com o PEG. A carga positiva das nanopartículas pode ser de interesse para favorecer a interação das mesmas com
25 superfícies mucosas. Não obstante a carga neutra pode resultar mais interessante para a administração parenteral das mesmas.

O sistema que compreende nanopartículas para a liberação de uma molécula biologicamente ativa tal como
30 definida acima apresenta um teor de quitosana no conjugado

superior a 50%, preferivelmente superior a 75% em peso. Por sua vez o teor de PEG no conjugado é inferior a 50%, preferivelmente inferior a 25%.

A quitosana é um polímero de origem natural derivado da quitina (poli-N-acetil-D-glicosamina), de onde foi eliminada uma parte importante dos grupos acetil dos N por hidrólise. Em general, o grau de desacetilação se encontra em uma faixa compreendida entre 30 e 95%, preferivelmente entre 60 e 95%, o que indica que entre 5 e 40% dos grupos amino estão acetilados. Apresenta desta forma uma estrutura aminopolissacarídica e caráter catiônico. Compreende a repetição de unidades monoméricas de fórmula (I):



15

(I)

onde n é um número inteiro, e além disto m unidades em que o grupo amino está acetilado. A soma de n+m representa o grau de polimerização, isto é, o número de unidades monoméricas na cadeia da quitosana.

A quitosana empregada para a obtenção dos conjugados quitosana-PEG da presente invenção apresentam um peso molecular compreendido entre 5 e 2000 kDa, preferivelmente entre 10 e 500 kDa, mais preferivelmente entre 10 e 100 kDa. Exemplos de quitosanas comerciais que se pode

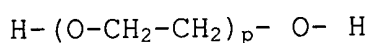
25

utilizar são UPG 113, UP CL 213 e UP CL113 que se pode obter da NovaMatrix, Drammen, Noruega.

O número de unidades monoméricas que compreendem a quitosana empregada na obtenção dos conjugados quitosana-
 5 PEG está compreendido entre 30 e 3000 monômeros, preferivelmente entre 60 e 600.

Como alternativa a quitosana se pode utilizar um derivado da mesma, entendendo-se como tal uma quitosana na qual se modificou um ou mais grupos hidroxila e/ou um ou
 10 mais grupos amino, com a finalidade de se elevar a solubilidade da quitosana ou aumentar o caráter mucoadesivo da mesma. Estes derivados incluem, entre outros, quitosanas acetiladas, alquiladas ou sulfonatadas, derivados tiolados, tal como os descritos em Roberts,
 15 *Chitin Chemistry*, Macmillan, 1992, 166. Preferivelmente quando se utiliza um derivado se seleciona entre O-alquiléteres, O-acilésteres, trimetilquitosana, quitosanas modificadas com polietilenoglicol, etc. Outros derivados possíveis são os sais, tais como citrato, nitrato, lactato,
 20 fosfato, glutamato, etc. Em qualquer caso, o especialista na técnica sabe identificar as modificações que se podem realizar na quitosana sem afetar a estabilidade e viabilidade comercial da formulação final.

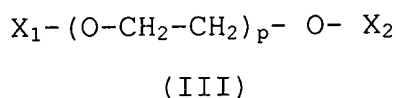
Por seu lado, o polietilenoglicol (PEG), em sua forma
 25 mais comum, é um polímero de fórmula (II):



(II)

onde p é um número inteiro que representa o grau de polimerização do PEG. Na presente invenção o grau de polimerização do PEG se encontra na faixa compreendida entre 50 e 500, o que corresponde a um peso molecular de entre 2 e 20 kDa, preferivelmente de entre 5 e 10 kDa.

Para a formação do complexo quitosana-PEG é necessário empregar-se um PEG modificado no qual um ou os dois grupos hidroxila terminais se encontram modificados. Entre os PEG modificados que se pode empregar para a obtenção dos conjugados quitosana-PEG se encontram aqueles que apresentam a fórmula (III):



15

onde:

X_1 é um grupo protetor de radicais hidroxila que bloqueia a função OH para reações posteriores. Os grupos protetores de hidroxila são bem conhecidos na técnica, grupos protetores representativos (incluindo o oxigênio a proteger) são os éteres silil tais como éter trimetilsilil, éter trietilsilil, éter tert-butildimetilsilil, éter tert-butildifenilsilil, éter triisopropilsilil, éter dietilisopropilsilil, éter t-hexildimetilsilil, éter trifenilsilil, éter di-tert-butilmetilsilil; éteres alquílicos tais como éter metílico, éter tert-butil, éter benzílico, éter p-metoxibenzílico, éter 3,4-dimetoxibenzílico, éter tritil; éter alil; éter alcóximetil tal como éter metóximetil, éter 2-metoxietóximetil, éter benzilóximetil, éter p-metoxi-

30

benziloximetil, éter 2-(trimetilsilil)etoximetil; éter tetrahidropiranil e éteres relacionados; éter metiltiometil; ésteres tais como éster acetato, éster benzoato; éster pivalato; éster metoxiacetato; éster
 5 cloroacetato; éster levulinato; carbonatos tais como carbonato de benzila, carbonato de p-nitrobenzila, carbonato de tert-butil, carbonato de 2,2,2-tricloroetila, carbonato de 2-(trimetilsilil)etila, carbonato de alila. Exemplos adicionais de grupos protetores de hidroxila podem
 10 ser encontrados em livros de referência tais como "Protective Groups in Organic Synthesis" de Greene e Wuts, John Wiley & Sons, Inc., Nova York, 1999. Em uma realização preferida o grupo protetor é um éter alquílico, mais preferivelmente é éter metílico.

15 X_2 pode ser um hidrogênio ou um grupo ponte que permita a ligação aos grupos amino da quitosana. Entre as moléculas ponte utilizadas preferidas, mas não exclusivas, está uma succinimida ou um derivado desta.

De forma alternativa X_1 pode ser igualmente um grupo
 20 que permita a ligação com outros grupos distintos do grupo amino. Por exemplo, para se obter a ligação com grupos SH se utiliza como molécula ponte a maleimida.

O número de grupos amino da quitosana que reagem com o PEG, ou o que é o mesmo, a funcionalização dos grupos
 25 amino da quitosana com o PEG, o que se conhece como PEGuilação, é compreendido entre 0,1% e 5%, preferivelmente entre 0,2% e 2%, mais preferivelmente entre 0,5% e 1%.

O conjugado de quitosana-PEG resultante apresenta um peso molecular compreendido entre 5 e 3000 kDa,
 30 preferivelmente entre 10 e 500 kDa.

O sistema de nanopartículas da invenção se caracteriza pelo fato de se haverem formado mediante reticulação iônica do conjugado quitosana-PEG. O agente de reticulação é um sal aniônico que permite a reticulação do
5 conjugado quitosana-PEG mediante gelificação iônica, favorecendo a formação espontânea das nanopartículas. Na presente invenção o agente de reticulação é um sal de polifosfato, sendo preferido o emprego de tripolifosfato de sódio (TTP). A reticulação para produzir o sistema de
10 nanopartículas é simples e conhecida do especialista na técnica, tal como mencionado nos antecedentes da invenção.

Um segundo aspecto da presente invenção constitui uma composição farmacêutica que compreende as nanopartículas previamente definidas. Exemplos de composições
15 farmacêuticas incluem qualquer composição líquida (suspensão de nanopartículas em água ou em água com aditivos tais como agentes de viscosidade, tampões de pH, etc) ou sólida (nanopartículas liofilizadas ou atomizadas formando um pó que se pode utilizar para a obtenção de
20 granulados, comprimidos ou cápsulas) para sua administração por via oral, bucal ou sub-lingual, tópica, ou em forma líquida ou semi-sólida para sua administração por via transdérmica, ocular, nasal, vaginal ou parenteral. No caso das vias não parenterais o contato das nanopartículas
25 com a pele ou mucosas poderá ser melhorada dotando as partículas de uma carga positiva importante, o que favorecerá sua interação com as citadas superfícies carregadas negativamente. No caso das vias parenterais, mais especificamente para a administração intravenosa,
30 estes sistemas oferecem a possibilidade de modular a

distribuição *in vivo* dos fármacos ou moléculas que podem estar associadas.

Em um aspecto preferido a formulação é administrada por via mucosa. A carga positiva que o conjugado
5 quitosana-PEG apresenta proporciona uma melhor absorção dos fármacos na superfície mucosa através de sua interação com a mucosa e as superfícies das células epiteliais que são carregadas negativamente.

As nanopartículas de quitosana-PEG são sistemas que
10 apresentam uma alta capacidade de associação de moléculas bioativas. Esta capacidade de associação depende do tipo de molécula incorporada assim como dos parâmetros de formulação apontados. Desta forma, outro aspecto da presente invenção é uma composição que compreende
15 nanopartículas de quitosana-PEG como as definidas previamente e pelo menos uma molécula biologicamente ativa.

O termo "molécula biologicamente ativa" refere-se a qualquer substância empregada no tratamento, cura, prevenção ou diagnóstico de uma doença ou que é empregada
20 para melhorar o bem-estar físico e mental de humanos e animais. Estas moléculas biologicamente ativas podem incluir desde fármacos de baixo peso molecular até moléculas do tipo de polissacarídeos, proteínas, peptídeos, lipídeos, oligonucleotídeos e ácidos nucleicos e
25 combinações destes. Exemplos de moléculas associadas a estas nanopartículas incluem proteínas como o toxóide tetânico e o toxóide diftérico, polissacarídeos como heparina, peptídeos como a insulina, assim como plasmídeos codificadores de diversas proteínas.

Em uma realização preferida a molécula biologicamente ativa é a insulina. Em outra realização preferida a molécula biologicamente ativa é o toxóide diftérico ou tetânico. Em outra realização preferida a molécula
5 biologicamente ativa é a heparina. Em outra realização preferida a molécula biologicamente ativa é um plasmídeo de DNA.

Os sistemas nanoparticulados da presente invenção também podem incorporar outras moléculas ativas que não
10 apresentam efeito terapêutico, mas que produzem composições cosméticas. Estas composições cosméticas incluem qualquer composição líquida (suspensão de nanopartículas) ou emulsão para sua administração por via tópica. Entre as moléculas ativas que podem ser incorporadas nas nanopartículas cabe
15 citar agentes antiacne, anti-fúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, anticaspa, branqueadores de pele, bronzeadores, absorventes de luz UV, enzimas, biocidas cosméticos, entre outros.

Outro aspecto da presente invenção é uma vacina que
20 compreende as nanopartículas previamente definidas e um antígeno. A administração de um antígeno com o sistema constituído pelas nanopartículas permite se obter uma resposta imunológica. A vacina pode compreender uma proteína, polissacarídeo ou pode ser uma vacina de DNA.
25 Estritamente falando, uma vacina de DNA é uma molécula de DNA que codifica a expressão de um antígeno que produzirá a uma resposta imunológica. Em uma realização preferida o antígeno é o toxóide tetânico e o toxóide diftérico.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a um
30 procedimento para a preparação de nanopartículas de

quitosana-PEG como as definidas previamente, que compreende:

- a) preparação de uma solução aquosa do conjugado quitosana-PEG;
- 5 b) preparação de uma solução aquosa do agente de reticulação; e
- c) mistura, sob agitação, das soluções das etapas a) e b), de modo a se obter espontaneamente as nanopartículas de quitosana-PEG mediante
- 10 gelificação iônica e conseqüente precipitação.

O pH da solução inicial do conjugado quitosana-PEG é modificado até alcançar valores compreendidos entre 4,5 e 6,5 mediante a adição de hidróxido de sódio previamente à mistura das soluções.

- 15 Em uma variante do procedimento, a relação quitosana-PEG/agente de reticulação resultante está compreendida entre 2/1 e 8/1, sendo preferida a relação 3/1, a qual proporciona formulações com uma polidispersão relativamente baixa. Não obstante, o emprego de relações quitosana-
- 20 PEG/agente de reticulação maiores assim como a preparação de partículas em meios mais ácidos também é possível.

- A presença do agente de reticulação permite o entrecruzamento do conjugado quitosana-PEG de tal maneira que é formada uma malha entre a qual se pode inserir uma
- 25 molécula biologicamente ativa que posteriormente pode ser liberada. Além disto, o agente de reticulação confere às nanopartículas as características de tamanho, potencial e estrutura que as torna adequadas como sistema de administração de moléculas biologicamente ativas.

A molécula biologicamente ativa pode ser incorporada diretamente nas soluções das etapas a) ou b), ou previamente ser dissolvida em uma fase aquosa ou orgânica, de modo que são obtidas espontaneamente as nanopartículas de quitosana-PEG contendo a molécula biologicamente ativa
5 mediante gelificação iônica e conseqüente precipitação.

Desta forma a incorporação da molécula biologicamente ativa pode ser realizada segundo os métodos a seguir:

- 10 a) a molécula ativa é dissolvida diretamente nas soluções do agente de reticulação ou de quitosana-PEG;
- b) a molécula ativa é dissolvida em uma solução aquosa ácida ou básica, previamente a sua incorporação nas soluções de agente de
15 reticulação ou de quitosana-PEG; ou
- c) a molécula ativa é dissolvida em um solvente orgânico polar, miscível em água, previamente a sua incorporação nas soluções de agente de reticulação ou de quitosana-PEG.

20 O procedimento de preparação das nanopartículas de quitosana-PEG pode compreender além disto uma etapa adicional, na qual as ditas nanopartículas são liofilizadas. Do ponto de vista farmacêutico é importante poder se dispor das nanopartículas na forma liofilizada já
25 que assim se melhora sua estabilidade durante o armazenamento. As nanopartículas de quitosana-PEG (com diferentes graus de PEGuilação) podem ser liofilizadas na presença de um crioprotetor como pode ser a glicose em uma concentração de 5%. Outros aditivos habituais podem estar
30 presentes. De fato, a determinação do tamanho da partícula

antes e depois de sua liofilização não é modificada significativamente. Isto é, as nanopartículas podem ser liofilizadas e re-suspendidas sem que se produza uma variação nas mesmas (tabela I).

5

Tabela I: Características das nanopartículas de CS-PEG antes e depois da liofilização.

Formulação	tamanho (nm)	P.I.*	tamanho (nm)	P.I.
	antes da liofilização		liofilizadas com 5% de glicose	
quitosana-PEG 0,5%	74,7 ± 9,5	0,231	78,6 ± 18,3	0,224
quitosana-PEG 1%	76,9 ± 6,0	0,500	87,7 ± 22,3	0,418

*P.I.: índice de polidispersão

10

A seguir, são descritos alguns exemplos ilustrativos que evidenciam as características e vantagens da invenção, não devem ser interpretados como limitativos do objeto da invenção.

15

EXEMPLOS

Exemplo 1

Otimização na preparação de nanopartículas de quitosana-PEG

As nanopartículas de quitosana-PEG se são preparadas segundo a técnica de gelificação iônica descrita para quitosana, por exemplo, no documento WO 9804244. Concretamente, a quitosana com 0,5% ou 1% de grau de peguilação (percentagem de grupos amino que estão funcionalizados com PEG) foi dissolvida inicialmente em água ultra-pura a uma concentração de 1 mg/ml. Com o

25

propósito de se estudar seu possível efeito sobre a formação das nanopartículas, o pH inicial da solução de quitosana-PEG foi modificado até alcançar valores compreendidos entre 4,5 e 6,5 mediante a adição de NaOH
5 antes da preparação das partículas. O tripolifosfato de sódio (TTP) também foi dissolvido em água a diferentes concentrações com o objetivo de se obter relações de quitosana-PEG/TTP de 2/1, 3/1 e 4/1. A formação das nanopartículas ocorre espontaneamente depois da adição de
10 um volume fixo da solução de TTP (0,6 ml) a um volume fixo da solução de quitosana-PEG (1,5 ml) sob agitação magnética.

O efeito que o grau de peguilação da quitosana, o pH da solução do polímero e a relação quitosana-PEG/TTP
15 provocam sobre o tamanho e polidispersão das nanopartículas é mostrado nas figuras 1A e 1B. A partir dos resultados obtidos se pode concluir que as nanopartículas de quitosana-PEG com um grau de peguilação de 0,5-1% podem ser preparadas facilmente com uma faixa ampla de condições
20 experimentais, sendo o pH o parâmetro mais influente no tamanho das nanopartículas. Além disto, o efeito do pH chega a ser mais marcante a medida que o grau de peguilação aumenta de 0,5 a 1%.

Por outro lado, a distribuição de tamanhos das
25 nanopartículas também é afetada pelo grau de peguilação da quitosana assim como pelo pH da solução de quitosana-PEG. Aparentemente, a relação ideal quitosana-PEG/TTP é de 3/1 para se obter formulações com uma dispersão relativamente baixa.

O tamanho das nanopartículas é determinado mediante espectroscopia de correlação fotônica, empregando-se para isto um Zetasizer III (Malvern Instruments, Malvern, UK). O tamanho das nanopartículas de quitosana-PEG oscilou entre
 5 70 e 310 nm.

Exemplo 2

Comparação entre as nanopartículas de quitosana e as de quitosana-PEG

10 Como se pode observar a partir da Tabela II, a peguilação altera a solubilidade da quitosana. Isto tem influência sobre a formação das nanopartículas. A relação ótima quitosana/TTP tipicamente situada entre 6/1 e 4/1 se desloca no caso da quitosana-PEG para valores menores,
 15 tipicamente entre 4/1 e 2/1. Estas diferenças são devidas provavelmente à modificação química da quitosana, que sofre uma alteração dos grupos disponíveis que podem interagir podendo alterar as condições de gelificação ionotrófica.

20 Tabela II

	quitosana	quitosana-PEG 0,5%	quitosana-PEG 1%
pH inicial	4,7-4,8	4,6-4,7	4,6-4,7
limite de solubilidade	6,4-6,5	6,9-7,1	7,1-7,2

No que diz respeito às nanopartículas, se pode observar que as nanopartículas preparadas a partir de quitosana peguilada são significativamente diferentes das
 25 constituídas de quitosana pura. Isto é ilustrado na tabela III, onde são mostradas as características das nanopartículas formadas por quitosana, quitosana-PEG com

graus de peguilação de 0,5% e 1% (no valor de pH inicial, em sua relação ideal de polímero).

A peguilação provoca uma redução marcada no tamanho das nanopartículas e na carga da superfície. Neste último
5 caso, o grau de peguilação também tem uma grande influência já que a carga da superfície se reduz ainda mais quando o grau de peguilação aumenta de 0,5% a 1%.

Tabela III

	tamanho (nm)	P.I.	potencial (mV)
quitosana, 4/1	265 ± 10	0,363	+29,1 ± 1,1
quitosana-PEG 0,5%, 3/1	74 ± 9	0,231	+12,1 ± 1,8
quitosana-PEG 1%, 3/1	77 ± 6	0,500	+1,6 ± 0,6

10 P.I.=índice de polidispersão

Exemplo 3

Formação e caracterização de nanopartículas de quitosana com diferentes graus de peguilação carregadas com

15 DNA

Para sua encapsulamento, DNA plasmidial foi incorporado à solução de TTP previamente à formação das nanopartículas. Esta solução de TTP contendo o DNA foi adicionada posteriormente à solução de quitosana-PEG e se
20 manteve sob agitação magnética. As cargas teóricas de DNA foram de 5, 10 ou 20% em relação à quantidade total de quitosana-PEG empregada para a preparação das nanopartículas (1 mg). A eficiência da encapsulamento do DNA plasmidial foi sempre superior a 90% como é confirmado

pelos ensaios de fluorescência (corante Pico Green dsDNA) e eletroforese em gel de agarose.

As tabelas IV, V e VI mostram as características das diferentes nanopartículas de quitosana e quitosana-PEG. Similarmente às nanopartículas sem carga, as formulações carregadas de DNA contendo PEG são muito menores e apresentam menos carga positiva em sua superfície que as formulações sem PEG.

Em todos os casos, a presença de DNA também causa alterações nas características dos veículos, especialmente a altas percentagens de DNA, onde a carga da superfície geralmente é reduzida. No que diz respeito ao tamanho da nanopartícula, cargas grandes de DNA permitem induzir a formação de estruturas mais reticuladas, o que provoca uma redução do tamanho da partícula. Isto se pode observar no caso de veículos não peguillados, onde o tamanho se reduz de aproximadamente 270-300 nm para 220 nm.

Entretanto, o tamanho dos veículos peguillados aumenta com a carga de DNA, especialmente quando se emprega quitosana-PEG com um grau de peguilação de 0,5%.

Tabela IV

quitosana sem PEG, 4/1	tamanho (nm)	P.I.	potencial (mV)
branco	265 ± 10	0,363	29,1 ± 1,1
+5% DNA	278 ± 17	0,340	40,5 ± 5,6
+10%DNA	309 ± 2	0,378	41,6 ± 0,8
+20%DNA	216 ± 7	0,363	35,2 ± 1,8

Tabela V

quitosana-PEG 0.5%, 3/1	tamanho (nm)	P.I.	potencial (mV)
-------------------------	--------------	------	----------------

branco	74 ± 9	0,231	+121 ± 1,8
+5% DNA	115 ± 14	0,227	+13,4 ± 2,1
+10%DNA	131 ± 13	0,207	+11,3 ± 3,9
+20%DNA	181 ± 8	0,209	+5,7 ± 1,6

Tabela VI

quitosana-PEG 1%, 3/1	tamanho (nm)	P.I.	potencial (mV)
branco	77 ± 6	0,500	+1,6 ± 0,6
+5% DNA	78 ± 7	0,485	+3,7 ± 0,4
+10%DNA	78 ± 10	0,256	+1,3 ± 2,1
+20%DNA	105 ± 2	0,229	-0,6 ± 0,4

Exemplo 45 Liberação *in vitro* de DNA plasmidial

DNA plasmidial foi eficazmente associado tanto a partículas de quitosana quanto de quitosana-PEG. Como é mostrado nas figuras 2A e 2B, não se detecta liberação de DNA plasmidial (segundo análise de eletroforese em gel de agarose) quando as nanopartículas carregadas com DNA plasmidial são incubadas durante mais de um mês, tanto em tampão acetato (pH: 4, pH: 7,4) quanto em água purificada (MQ).

15 **Exemplo 5**
Liberação *in vitro* de DNA plasmidial na presença de enzimas

Como se pode observar a partir da análise de eletroforese (Figura 3), o DNA plasmidial pode ser liberado das nanopartículas de quitosana e quitosana-PEG quando as nanopartículas carregadas de DNA plasmidial são incubadas

em tampão acetato a pH 6 na presença de quitosanase (0,6 mg/ml).

Estes resultados evidenciam que o DNA plasmidial foi eficazmente associado às nanopartículas, entretanto, não está irreversivelmente fixado a elas já que pode ser liberado quando o veículo polimérico é degradado enzimaticamente.

Exemplo 6

10 Eficácia na transfecção do DNA plasmidial (GFP) associado a nanopartículas de quitosana-PEG

A eficácia da transfecção mediante nanopartículas de quitosana e quitosana-PEG foi avaliada para a codificação do plasmídeo GFP em um modelo de linhagem celular HEK 293.

15 A figura 4 mostra o efeito que o grau de peguilação da quitosana (0,5% e 1%) provoca sobre a eficácia na transfecção de nanopartículas de quitosana de alto peso molecular (125 kDa, HMW CS NP) que contêm uma carga de 20% de DNA plasmidial (pDNA). A dose de plasmídeo por poço foi de 1 µg. Os resultados indicam que um grau de peguilação de 0,5% tem um efeito positivo na capacidade de transfecção destas nanopartículas. Este grau de peguilação foi escolhido para os experimentos posteriores. Os resultados mostrados na figura 4b indicam que a eficácia da transfecção aumenta com a carga de pDNA das nanopartículas. Esta observação é interessante já que a dose de plasmídeo foi constante (1 µg) e por tanto, a dose de nanopartículas se reduz a medida que a carga de pDNA aumenta.

25 O efeito da carga de plasmídeo sobre a eficácia na transfecção também foi avaliado para nanopartículas de

30

quitosana-PEG de baixo peso molecular (10 kDa, LMW CS-PEG NP) neste caso, o maior nível de expressão foi observado para a carga menor (5%) (Figura 5a). Por outro lado, para esta carga baixa (5% pDNA) se observou que a peguilação
5 apresentava um efeito negativo na eficácia de transfecção (Figura 5b).

A conclusão principal destes experimentos é que a peguilação da quitosana tem um efeito positivo (HMW CS-PEG NP) ou negativo (LMW CS-PEG NP) dependendo do peso
10 molecular da quitosana.

Exemplo 7

Efeito biológico da administração intranasal de insulina encapsulada e insulina livre a uma concentração de
15 10 U/kg

Para realizar o encapsulamento da insulina nas nanopartículas de quitosana, foram dissolvidos previamente 2,4 mg de insulina em uma solução de NaOH à qual se incorporou posteriormente 1,2 ml de TTP. Esta mistura foi
20 adicionada depois a 3 ml de quitosana. Transcorridos 5 minutos sob agitação magnética, a preparação foi centrifugada a 10.000 g por 40 minutos. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi dissolvido em tampão. Por sua vez, para a preparação das nanopartículas de quitosana-PEG
25 foi realizado o mesmo procedimento, adicionando-se, no entanto, 10 mg/ml de PEG 400 a 2 mg/ml de quitosana.

O tamanho final das nanopartículas de quitosana, determinado por espectroscopia de correlação fotônica, foi de 605 ± 15 nm enquanto que o das nanopartículas de
30 quitosana-PEG foi de 590 ± 6 nm.

Inicialmente, a diabetes é induzida em ratos Wistar, pesando entre 200 e 220 g, por injeção de estreptozotocina (65 mg/kg i.v.) em um tampão citrato a pH 4,5. Foram considerados diabéticos quando a concentração de glicemia era acima de 400 mg/dl transcorridas três semanas de
5 tratamento com estreptozotocina.

Para realizar este experimento foram empregados ratos submetidos a jejum. Os ratos foram divididos em diferentes grupos dependendo da formulação que lhes seria
10 administrada. As diferentes formulações consistiam em: uma solução controle (tampão acetato, pH 4,3), insulina dissolvida em tampão acetato, insulina dissolvida em solução de quitosana, insulina associada a nanopartículas de quitosana e insulina associada a nanopartículas de
15 quitosana-PEG, sendo a concentração de insulina de 10 U por kg de massa corporal. A administração destas formulações foi realizada colocando-se um pequeno volume das mesmas (10-20 µl) em cada orifício nasal utilizando-se uma pipeta Eppendorf, os ratos estando anestesiados com éter em
20 posição costal. Posteriormente, os animais foram mantidos conscientes durante todo o experimento com a finalidade de se evitar qualquer influência que a anestesia pudesse provocar nos níveis de glicose no sangue.

Para se determinar os níveis de glicose no sangue,
25 foram coletadas amostras de sangue da veia da cauda, antes da administração nasal e a cada quarto de hora depois até finalizados 90 minutos. Posteriormente, foram coletadas a cada hora durante 2 a 7 horas e por último transcorridas 24 horas desde a administração nasal. O nível de glicose no
30 sangue foi determinado imediatamente empregando-se um

analisador de glicose (Prestige da Chronolyss). Durante o experimento, os ratos foram mantidos em jejum.

Como é mostrado na figura 6, a administração nasal de tampão acetato, pH 4,3, provoca a redução lenta e progressiva da glicemia em função do tempo, sendo a redução máxima de 28% em relação aos valores de controle, transcorridas 6 horas desde a administração. A administração nasal de 10 U/kg de insulina em solução de tampão acetato não alterou significativamente o resultado anterior. Entretanto, quando a insulina está associada a nanopartículas de quitosana-PEG, os níveis de glicemia são reduzidos 18% ($p < 0,01$) em apenas 15 minutos depois da administração, chegando a alcançar uma redução máxima de 45-50% ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente) aos 45 minutos da dita administração. Deve ser ressaltado que, esta redução se mantém transcorridas pelo menos 7 horas desde a administração nasal. Da mesma forma, se observa uma redução nítida nos níveis de glicemia quando se administra, por via intranasal, insulina associada a nanopartículas de quitosana. Neste caso, a glicemia se reduz significativamente a partir dos 30 minutos, concretamente em 16% ($p < 0,01$) sendo a redução máxima de 32% ($p < 0,001$) observada depois de 2 horas desde a administração intranasal. Quando a insulina é dissolvida em uma solução de quitosana também se reduz a glicemia, no entanto em um grau significativamente menor que quando a insulina está associada a nanopartículas de quitosana-PEG.

Exemplo 8

Efeito das nanopartículas que contêm insulina sobre a resposta glicêmica a uma administração oral de glicose.

Para realizar este experimento foram empregados camundongos diabéticos submetidos a jejum durante a noite. Receberam por via nasal cada uma das preparações descritas no exemplo 7. Transcorrida uma hora, cada grupo de camundongos recebeu por via oral uma administração de glicose de 2 g por cada kg de peso corporal. A glicemia foi determinada em sangue de amostras coletadas da veia da cauda antes da administração de glicose e depois de 10, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos.

A figura 7 mostra o efeito das nanopartículas que contêm insulina sobre a resposta glicêmica à administração oral de glicose. Nos camundongos de controle que receberam tampão acetato, a administração oral de glicose foi seguida de um aumento da glicemia cujo valor máximo, 105% ($p < 0,001$), foi alcançado 30 minutos depois. Posteriormente, a glicemia se reduziu suavemente durante 2 horas. Por sua vez, a insulina dissolvida em tampão acetato (10 U/kg) não alterou significativamente este resultado.

Entretanto, a mesma quantidade de insulina em solução de quitosana aumentou a resposta glicêmica à glicose em 189% ($p < 0,05$) enquanto que a insulina associada a nanopartículas de quitosana ou quitosana-PEG a aumentou em 193% ($p < 0,01$) e 225% ($p < 0,01$) respectivamente.

Portanto, comparando-se as A.U.C. (área abaixo da curva) a partir das diferentes formulações analisadas, a preparação mais efetiva foi a correspondente a insulina associada a nanopartículas de quitosana-PEG, seguida da

insulina associada a nanopartículas de quitosana e por último a correspondente a insulina em solução de quitosana.

Estes resultados evidenciam que o emprego das nanopartículas de quitosana-PEG descritas na presente invenção aumenta a absorção nasal de insulina em camundongos diabéticos. Os resultados experimentais mostram que a insulina (10 U/kg de peso corporal) associada a nanopartículas de quitosana-PEG reduz consideravelmente a glicemia a partir dos 15 minutos até pelo menos 7 horas depois da liberação intranasal e melhora a resposta glicêmica quando se produz uma carga oral de glicose. Um efeito menos acentuado se detecta com 4 U/kg de insulina associada às ditas nanopartículas.

Quando a insulina é associada a nanopartículas constituídas unicamente por quitosana ou quando a insulina se encontra em solução com quitosana, a eficiência é menor que quando está associada a nanopartículas quitosana-PEG, enquanto que a insulina livre não apresenta qualquer efeito significativo sobre os parâmetros biológicos depois de sua liberação intranasal em camundongos diabéticos.

Exemplo 9

Avaliação *in vivo* da resposta imunológica provocada pelas nanopartículas carregadas com toxóide diftérico.

A associação do toxóide diftérico (TD) às nanopartículas de quitosana ou quitosana-PEG é realizada por incorporação do TD a uma solução aquosa de TTP (300 µg de TD). As nanopartículas se formam espontaneamente pela adição de diferentes volumes da solução aquosa de TTP (1 mg/ml) a 3 ml de uma solução de quitosana ou quitosana-PEG

(1 mg/ml) com agitação magnética. Os volumes da solução de TTP são calculados com a finalidade de se conseguir relações quitosana:TTP de 8:1 e 2:1. A quitosana é comercializada na forma de seu sal de hidrocloreto, Protosan Cl[®] 113 e Protosan Cl[®] 213 com um grau de desacetilação de 86%. As nanopartículas de quitosana são isoladas por centrifugação a 10.000 g por 40 minutos a 5°C. No caso de quitosana-PEG, as nanopartículas são coletadas com um ultra-filtro de centrifugação (Amicon[®] ultra-4 100000 NMWL, Millipore) a 3800 g por 30 minutos. O sobrenadante é eliminado e as nanopartículas são re-suspendidas em tampão fosfato salino de pH 7,4 para sua administração aos camundongos.

A imunogenicidade das formulações de quitosana e quitosana-PEG foi determinada com camundongos mediante imunização intranasal. Foram empregados camundongos BALB/c de 6 semanas de idade e 22-25 g de peso. Os camundongos foram divididos em 5 grupos. Dois grupos foram tratados com nanopartículas de quitosana carregadas com TD (CS-113 Cl, CS-213 Cl) e um grupo com nanopartículas de quitosana-PEG carregadas com TD. A dose empregada foi de 10 µg de TD incorporados em 100 µg de nanopartículas em 10 µl de tampão fosfato de pH 7,4, administrando-se 5 µl em cada orifício nasal. Outro grupo foi tratado com toxóide livre (10 µg/camundongo) em tampão fosfato salino de pH 7,4. Além disto, como controle, um grupo recebeu uma vacina de DTP (difteria, tétano e pertusse) por via intraperitoneal, adsorvida em fosfato de alumínio (10 µg/camundongo). As doses foram administradas nos dias 0, 7 e 14 a camundongos conscientes.

Para realizar os ensaios de resposta imunológica *in vivo*, foram coletadas amostras de sangue da cauda dos camundongos nos dias 14, 28, 42, 56 e 70 depois da administração da primeira dose. Por sua vez, foram
5 coletadas também amostras de lavagem de saliva, bronco-alveolar e intestinal no dia 70. A salivação foi induzida mediante injeção intraperitoneal de pilocarpina (50 μ l, 1 mg/ml). Foi coletada uma alíquota de 100 μ l do fluxo inicial de saliva de cada camundongo. Posteriormente os
10 camundongos foram anestesiados com pentobarbital e foram sacrificados. As lavagens bronco-alveolares foram obtidas injetando-se e aspirando-se 5 ml de meio de lavagem na traquéia para inflar os pulmões mediante uma cânula intravenosa. Por sua vez, os segmentos intestinais
15 (duodeno, jejuno, íleo) foram retirados assepticamente e homogeneizados em 4 ml de uma solução de 1 mM PMSF, 1 mM de ácido iodoacético e 10 mM de EDTA. As amostras foram clarificadas por centrifugação e azida sódica, PMSF e soro bovino foram adicionados como conservantes. Todas as
20 amostras foram armazenadas a -20°C até a realização dos ensaios de concentração de anticorpos.

A avaliação das respostas de anticorpo em soro e em tecidos de mucosa foi realizada por um teste ELISA. Em primeiro lugar, as microplacas (DYNEX, immulon[®]) foram
25 cobertas com 100 μ l de TD (4 μ g/poço) em 0,05 M de tampão carbonato de pH 9,6 e incubadas durante a noite a 4°C . Entre as etapas os poços foram lavados três vezes com PBST de pH 7,4 (0,01 M PBS, ou tampão fosfato, contendo 5% v/v de Tween[®] 20). Com a finalidade de minimizar as reações não
30 específicas, foram adicionados a todos os poços 100 μ l de

PBSTM (PBST contendo 5% p/v de leite desnatado em pó e 0,1% p/v de azida sódica como conservante) incubou-se por 1 hora a 37°C. Após lavagem com PBST, as amostras foram diluídas em série em duas etapas em PBSTM e as placas foram incubadas por mais 2 horas a 37°C. Posteriormente, foram diluídos 100 µl de conjugado de peroxidase de imunoglobulina IgG anti-camundongo de cabra a 1:2000 em PBSTM, isto foi adicionado aos poços e incubou-se a 37°C por 2 h. As placas foram lavadas e foram adicionados aos poços 50 µl de o-fenilendiamina dihidroclorato (0,45 mg/ml) em 0,05 M de tampão citrato-fosfato de pH 5,0 como substrato. Após aquecimento (30 minutos a 37°C) as placas foram lidas a 450 nm em um leitor de microplacas (3350-UV, Biorad).

Os níveis de IgG anti-difteria provocados pelas nanopartículas carregadas com TD e a solução controle de TD após uma imunização intranasal são mostrados na figura 8. Nesta figura, são apresentados também os resultados correspondentes à formulação comercial (TD adsorvido em fosfato de alumínio) administrada por via intraperitoneal. Em termos gerais, os resultados indicam que, transcorrido o primeiro mês, os níveis de IgG observados para nanopartículas carregadas com TD foram significativamente melhores que os correspondentes à vacina fluida ($p < 0,05$). De fato, estes valores são comparáveis com os obtidos para a formulação utilizada como adjuvante (TD adsorvida em fosfato de alumínio) administrada por via parenteral. Conseqüentemente, estes resultados refletem claramente o efeito adjuvante das formulações contendo as nanopartículas. Outra observação a se ressaltar foi a crescente e duradoura resposta imunológica a no tempo. Finalmente, no que diz

respeito à influência da composição das nanopartículas, é interessante se apontar que o peso molecular da quitosana não apresenta qualquer efeito sobre a resposta imunológica alcançada pelas nanopartículas de quitosana, entretanto, a

5 PEGuilação da quitosana tem uma consequência marcada na eficácia das nanopartículas. De fato, transcorrido um mês, os níveis de IgG foram significativamente maiores para as nanopartículas de quitosana-PEG que para as nanopartículas de quitosana.

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema que compreende nanopartículas para a liberação de moléculas biologicamente ativas, **caracterizado** pelo fato das nanopartículas compreenderem um conjugado que compreende a) pelo menos 50% em peso de quitosana ou um derivado do mesmo e b) menos de 50% em peso de polietilenoglicol (PEG) ou um derivado do mesmo, onde ambos os componentes a) e b) estão unidos covalentemente por meio dos grupos amino do quitosana, e pelo fato das ditas nanopartículas se encontrarem reticuladas mediante um agente de reticulação.

2. Sistema de acordo com reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato da proporção de quitosana ou um derivado deste em relação ao polietilenoglicol ser preferivelmente superior a 75% em peso.

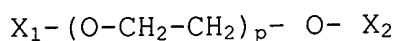
3. Sistema de acordo com reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato da proporção de polietilenoglicol ser preferivelmente inferior a 25% em peso.

4. Sistema de acordo com as reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato do grau de polimerização do quitosana ou do número de unidades monoméricas que compreendem o quitosana ou um derivado deste estar compreendido entre 30 e 3000, preferivelmente entre 60 e 600.

5. Sistema de acordo com as reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato do quitosana ou seu derivado apresentarem um peso molecular compreendido entre 5 e 2000 kDa, preferivelmente entre 10 e 500 kDa, mais preferivelmente entre 10 e 100 kDa.

6. Sistema de acordo com as reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato do quitosana ou seu derivado apresentarem um grau de desacetilação compreendido entre 30% e 95%, preferivelmente entre 60% e 95%.

5 7. Sistema de acordo com as reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato do PEG ser um PEG modificado que apresenta uma fórmula (III):



10

onde X_1 é um grupo protetor de radicais hidroxila, X_2 é um hidrogênio ou um grupo ponte que permita a ligação aos grupos amino do quitosana, e p é o grau de polimerização.

8. Sistema de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de X_1 ser um grupo alquil, preferivelmente metil.

9. Sistema de acordo com as reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato do PEG apresentar um grau de polimerização compreendido entre 50 e 500.

20 10. Sistema de acordo com as reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato do PEG apresentar um peso molecular compreendido entre 2 e 20 kDa, preferivelmente entre 5 e 10 kDa.

11. Sistema de acordo com as reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato da funcionalização dos grupos amino do quitosana ou seu derivado com PEG estar compreendida entre 0,1% e 5%, preferivelmente entre 0,5% e 1%.

12. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de
30 compreender adicionalmente uma molécula biologicamente

ativa selecionada do grupo consistindo em fármacos de baixo peso molecular, polissacarídeos, proteínas, peptídeos, lipídeos, oligonucleotídeos e ácidos nucleicos e combinações destes.

5 13. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizado** pelo fato do agente de reticulação ser um sal de polifosfato, preferivelmente tripolifosfato de sódio.

10 14. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** pelo fato do tamanho médio das nanopartículas estar compreendido entre 1 e 999 nanômetros, preferivelmente entre 50 e 800 nm.

15 15. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** pelo fato da carga elétrica (potencial Z) estar compreendida entre +0,1 mV e +50 mV, preferivelmente entre +1 e +40 mV.

20 16. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de compreender um sistema como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15 e uma molécula biologicamente ativa capaz de prevenir, aliviar ou curar doenças.

 17. Composição de acordo com a reivindicação 16, **caracterizada** pelo fato de ser para administração por via oral, bucal, sublingual, tópica, transdérmica, ocular, nasal, vaginal o parenteral.

25 18. Composição de acordo com as reivindicações 16 ou 17, **caracterizada** pelo fato da molécula biologicamente ativa ser selecionada de polissacarídeos, proteínas, peptídeos, lipídeos, oligonucleotídeos, ácidos nucleicos e combinações destes.

19. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, **caracterizada** pelo fato da molécula biologicamente ativa ser insulina, heparina, antígenos protéicos ou DNAs plasmidiais.

5 20. Composição cosmética **caracterizada** pelo fato de compreender um sistema para a liberação de uma molécula biologicamente ativa como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

10 21. Composição cosmética de acordo com a reivindicação 20, **caracterizada** pelo fato da molécula ativa ser selecionada de agentes antiacne, antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, anticaspa, branqueadores de pele, bronzecedores, absorventes de luz UV, enzimas e biocidas cosméticos.

15 22. Vacina **caracterizada** pelo fato de compreender um sistema para a liberação de uma molécula biologicamente ativa como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15 e um antígeno.

20 23. Vacina de acordo com a reivindicação 22, **caracterizada** pelo fato do antígeno ser selecionado de proteínas, polissacarídeos e moléculas de DNA.

24. Vacina de acordo com a reivindicação 22 o 23, **caracterizada** pelo fato do antígeno ser o toxóide tetânico ou o toxóide diftérico.

25 25. Processo para a obtenção de um sistema para a liberação controlada de uma molécula biologicamente ativa conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizado** pelo fato de compreender:

a) preparação de uma solução aquosa do conjugado
30 quitosana-PEG;

b) preparação de uma solução aquosa do agente de reticulação; e

5 c) mistura, sob agitação, das soluções obtidas nas etapas a) e b), de modo que se obtêm espontaneamente as nanopartículas de quitosana-PEG mediante gelificação iônica e conseqüente precipitação.

26. Processo para a obtenção de nanopartículas de acordo com reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato do
10 agente de reticulação ser um tripolifosfato, preferivelmente tripolifosfato de sódio.

27. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 e 26, **caracterizado** pelo fato da molécula biologicamente ativa ser dissolvida previamente em a) ou em
15 b) ou em outra fase aquosa ou orgânica que se adiciona em a) o b).

28. Processo de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato da molécula biologicamente ativa ser selecionada de insulina, heparina, DNA plasmidial,
20 toxóide tetânico e toxóide diftérico.

1/8
Figura 1A

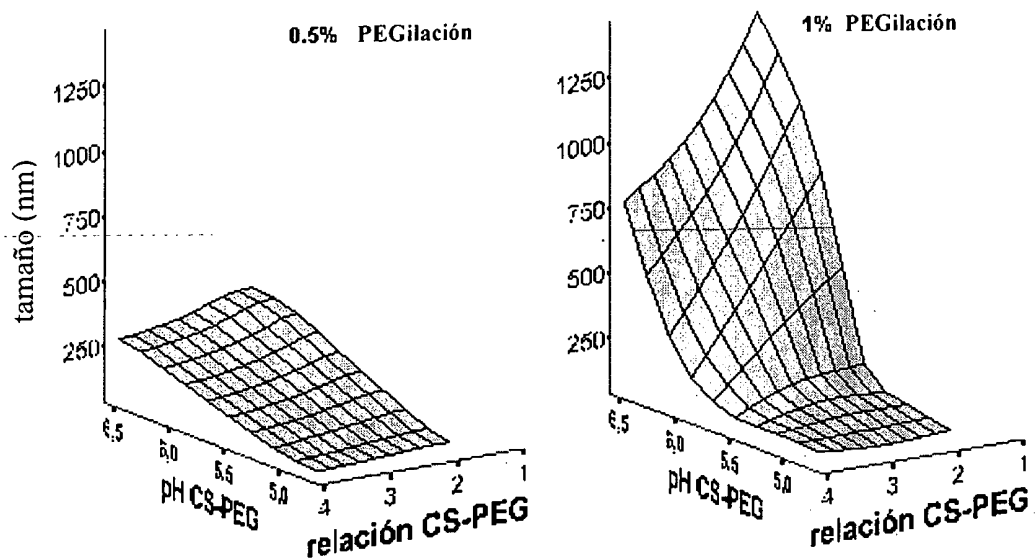


Figura 1B

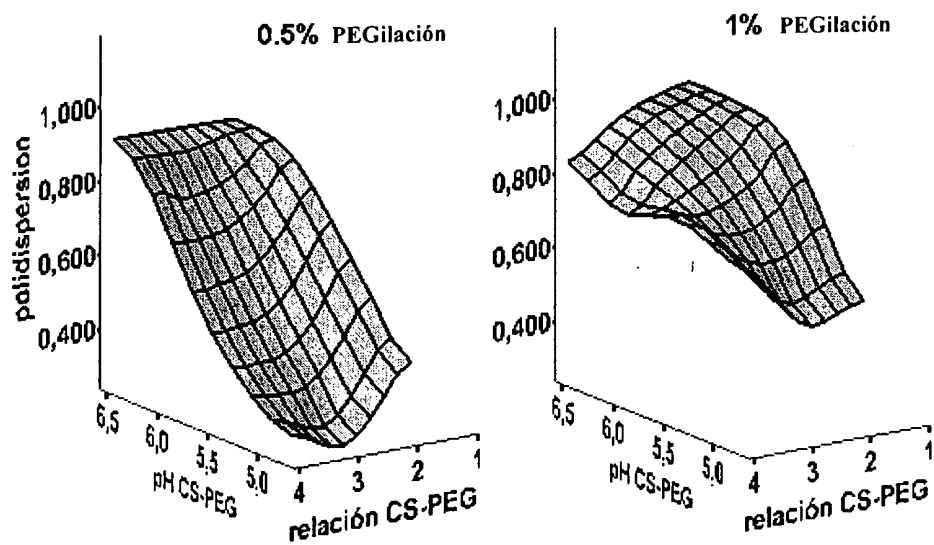


Figura 2A

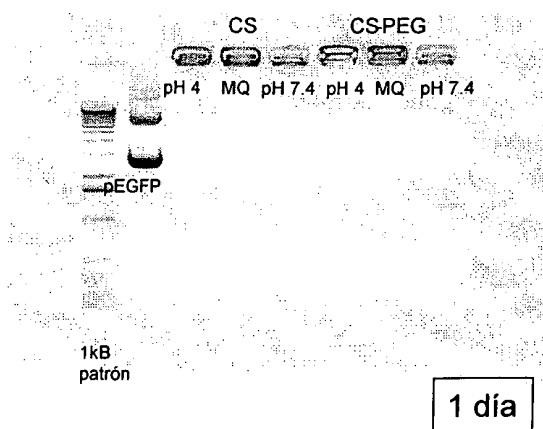


Figura 2B

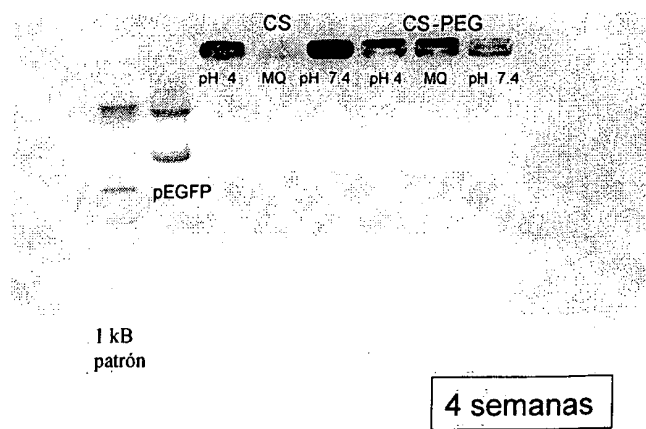


Figura 3

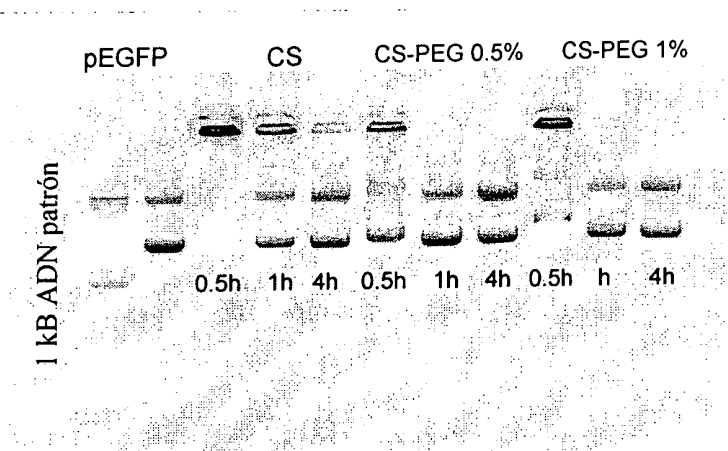


Figura 4A

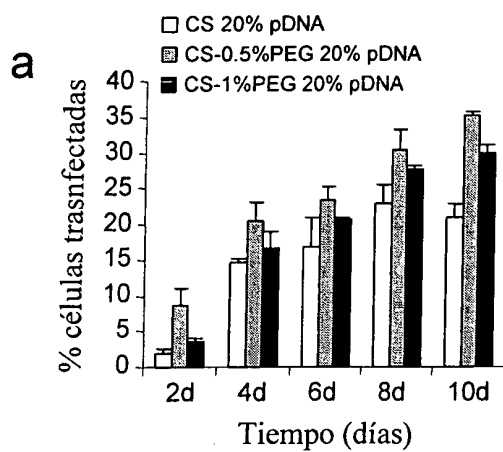


Figura 4B

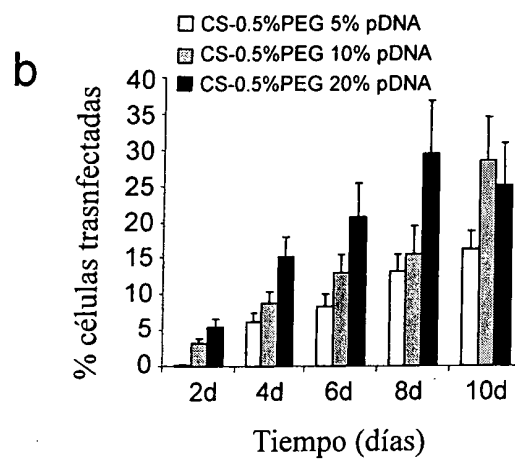


Figura 5A

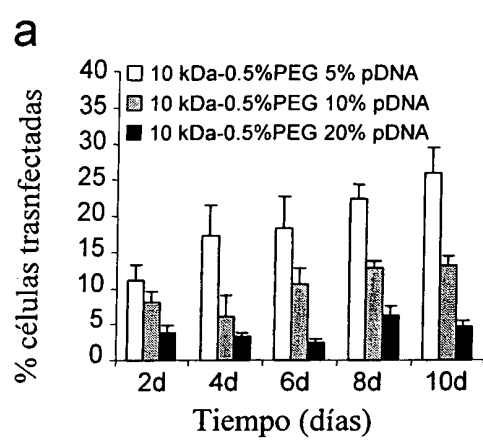


Figura 5B

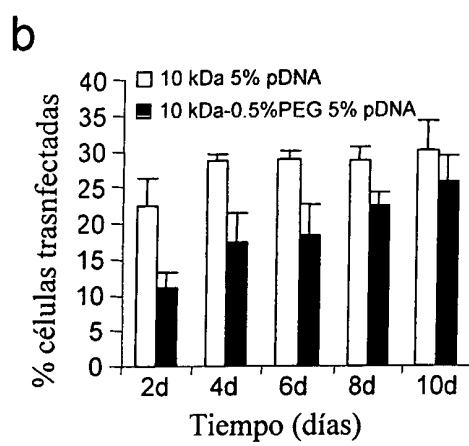


Figura 6

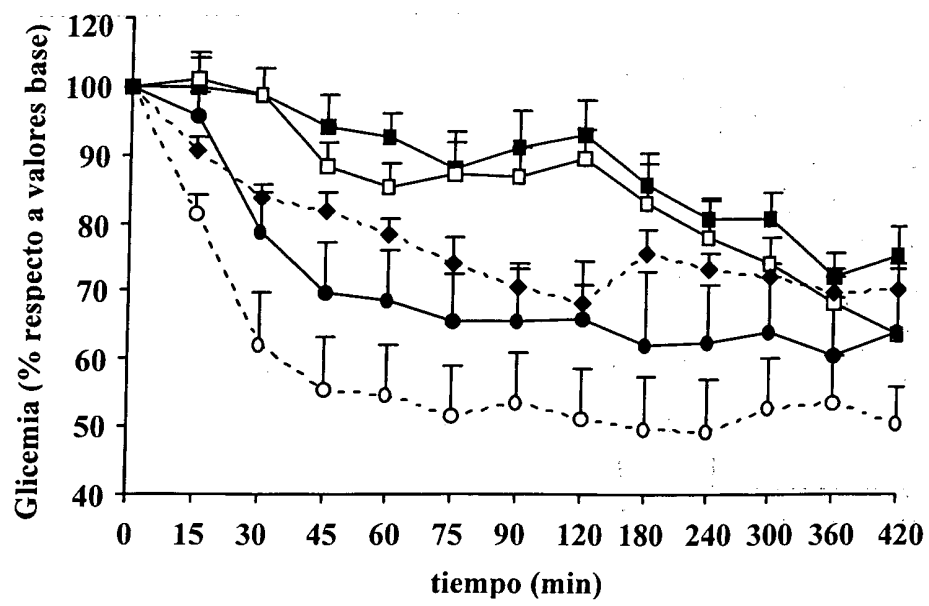


Figura 7

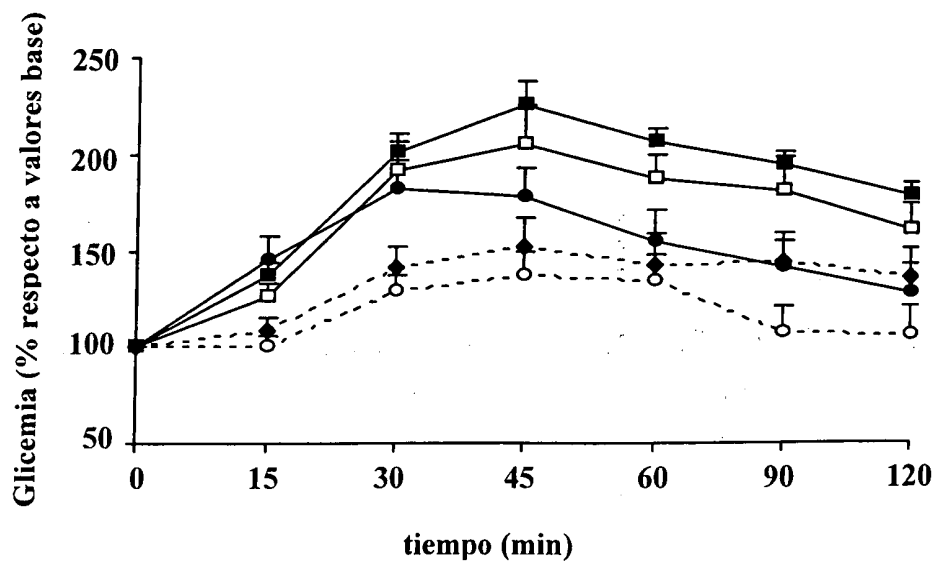
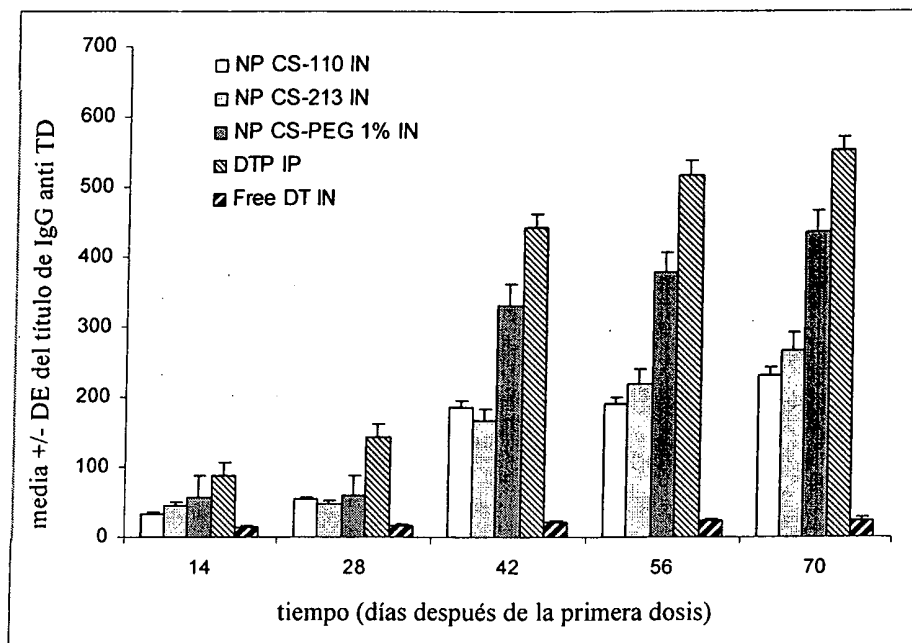


Figura 8



PI0608635-7

RESUMO

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E POLIETILENOGLICOL COMO
SISTEMA DE ADMINISTRAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOLOGICAMENTE ATIVAS

5

A invenção refere-se a sistemas nanoparticulados para a liberação de moléculas biologicamente ativas compreendendo polímero quitosana ou seus derivados, modificado quimicamente com polietilenoglicol e reticulado com um agente de reticulação. Estes sistemas são especialmente úteis para composições farmacêuticas, vacinas e formulações cosméticas.

DESENHOS

Figura 1A

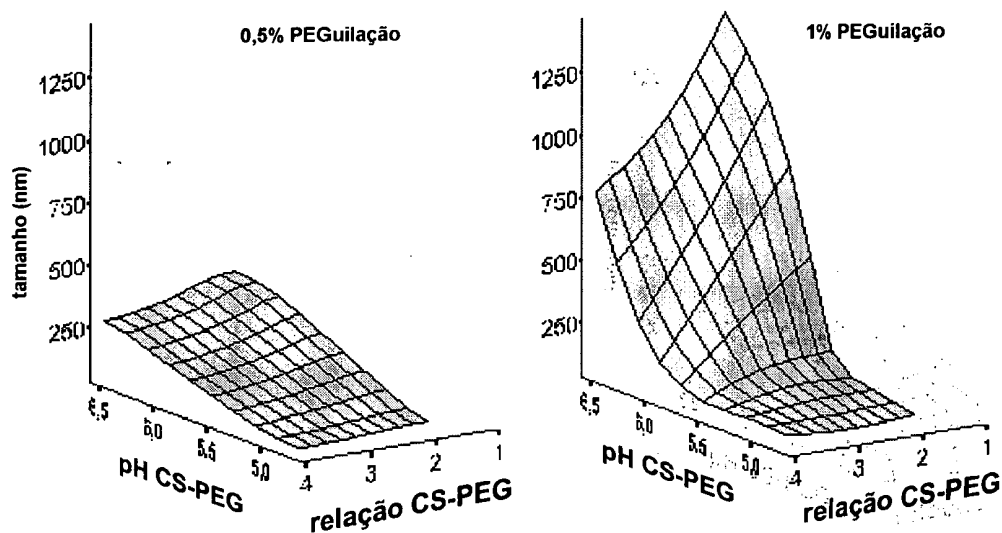


Figura 1B

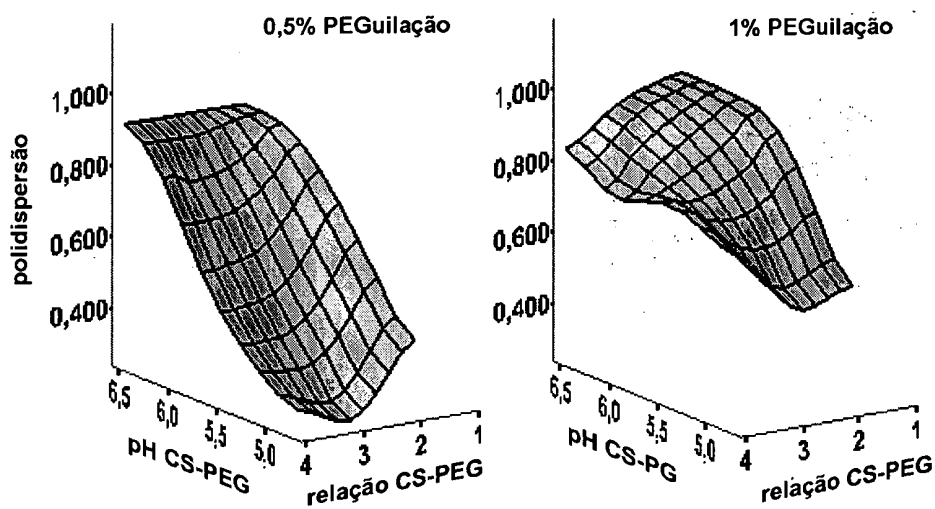


Figura 2A

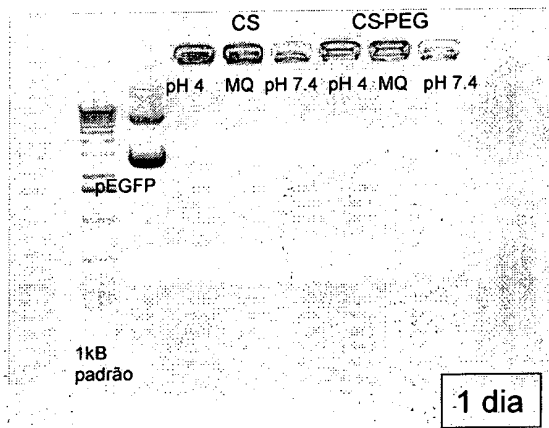


Figura 2B

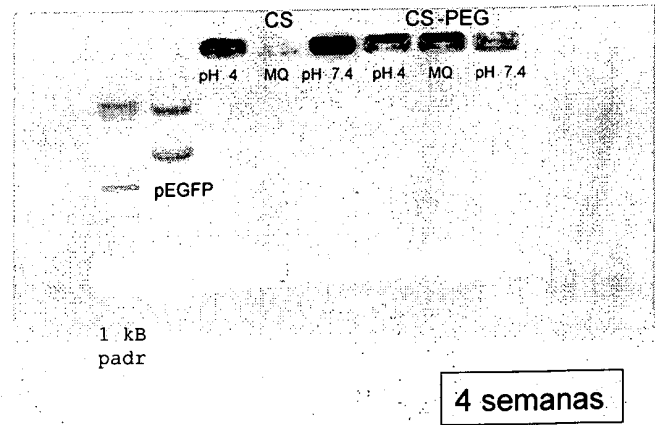


Figura 3

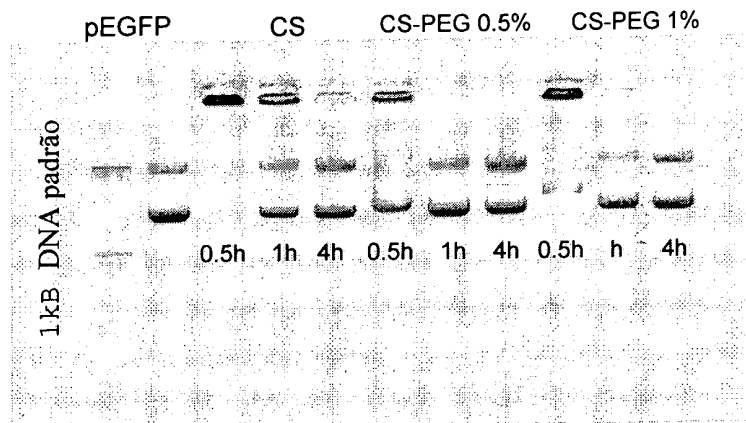


Figura 4A

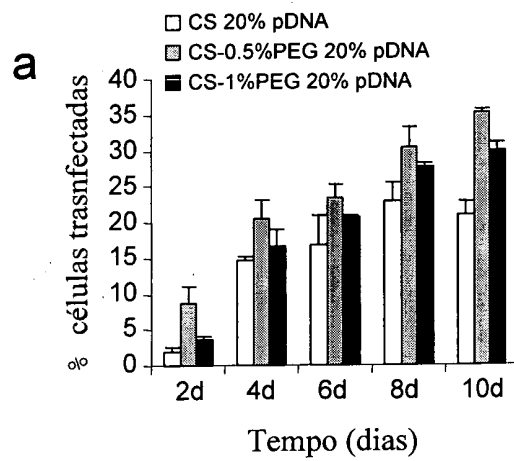


Figura 4B

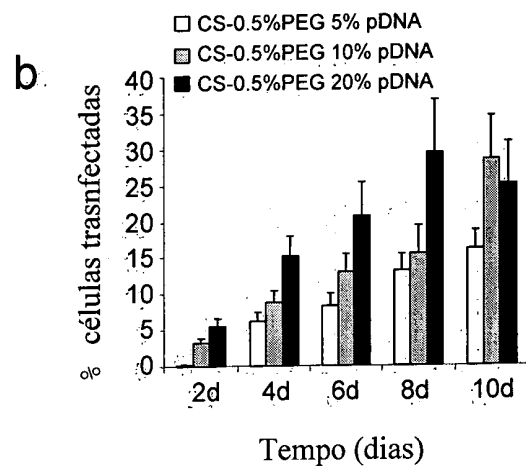


Figura 5A

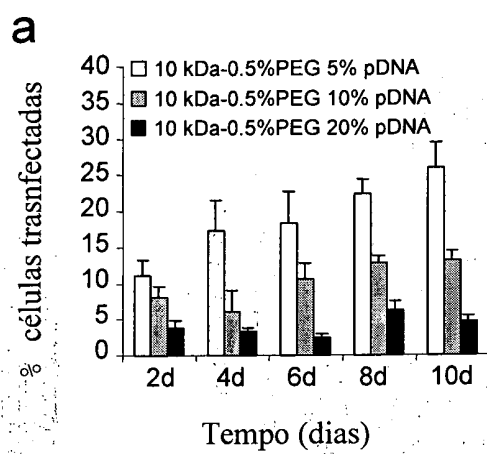


Figura 5B

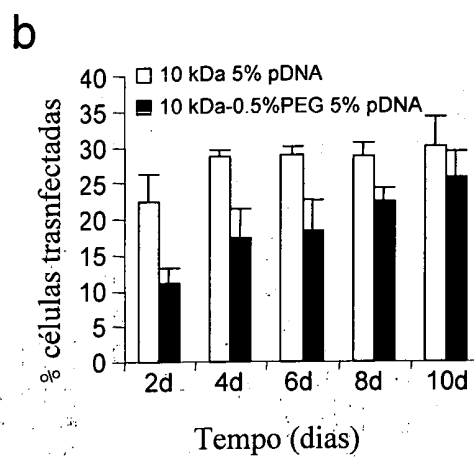


Figura 6

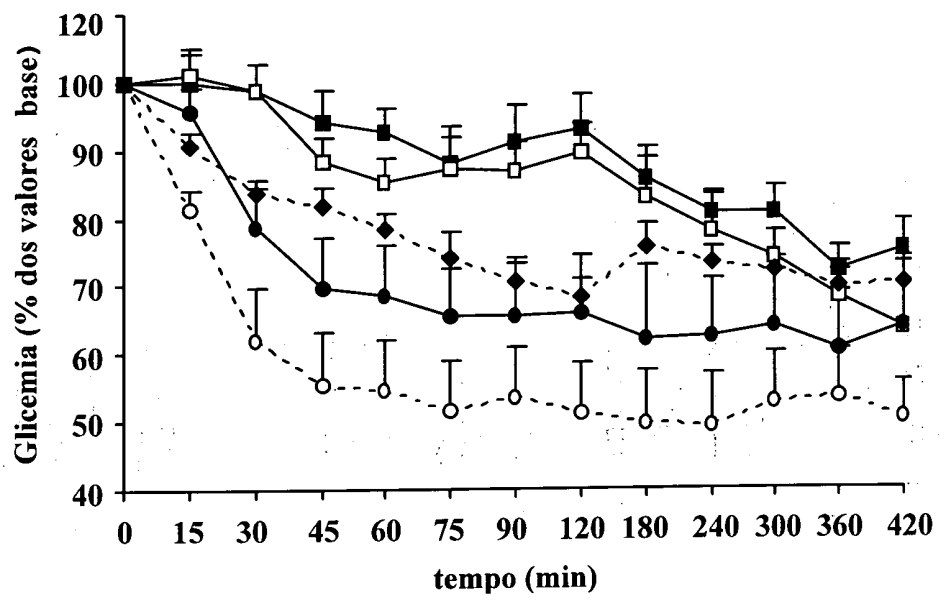


Figura 7

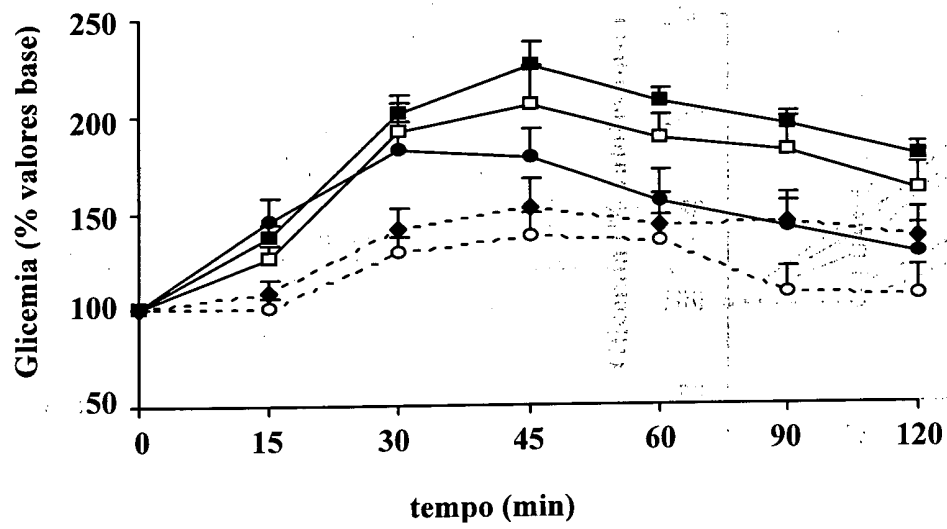


Figura 8

