

(51) Classificação Internacional:
A61K 9/00 (2013.01) **A61K 47/12** (2013.01)
A61K 31/4745 (2013.01) **A61P 13/10**
(2013.01)
A61P 35/00 (2013.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2010.02.05	(73) Titular(es): TELORMEDIX SA VIA DELLA POSTA 10 6934 BIOGGIO CH
(30) Prioridade(s): 2009.02.06 WO PCT/EP2009/000834	
(43) Data de publicação do pedido: 2011.12.14	(72) Inventor(es): ROBERTO MAJ LORENZO LEONI CARLO VECCHIO IT CH IT
(45) Data e BPI da concessão: 2013.12.04 024/2014	(74) Mandatário: ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO**
IMIDAZOQUINOLIN(AMINAS) E SEUS DERIVADOS ADEQUADAS PARA ADMINISTRAÇÃO LOCAL

(57) Resumo:

PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE, EM GERAL, AO CAMPO DE MODULADORES DO SISTEMA IMUNITÁRIO INATO, EM PARTICULAR A COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO IMIDAZOQUINOLIN(AMINAS) E SEUS DERIVADOS, DE UM MODO PREFERIDO, ADEQUADAS PARA ADMINISTRAÇÃO LOCAL, TAL COMO ADMINISTRAÇÃO INTRAVESICAL. ALÉM DISSO, A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE À UTILIZAÇÃO DE IMIDAZOQUINOLIN(AMINAS) E SEUS DERIVADOS PARA TRATAMENTO INTRAVESICAL DE DOENÇAS DA BEXIGA, TAIS COMO POR EXEMPLO, CANCRO DA BEXIGA E CISTITE. ALÉM DISSO, A PRESENTE INVENÇÃO COMPREENDE MÉTODOS DE TRATAMENTO PARA ESTAS DOENÇAS, BEM COMO MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DA INVENÇÃO.

RESUMO

"COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO IMIDAZOQUINOLIN(AMINAS) E SEUS DERIVADOS ADEQUADAS PARA ADMINISTRAÇÃO LOCAL"

A presente invenção refere-se, em geral, ao campo de moduladores do sistema imunitário inato, em particular a composições farmacêuticas compreendendo imidazoquinolin(aminas) e seus derivados, de um modo preferido, adequadas para administração local, tal como administração intravesical. Além disso, a presente invenção refere-se à utilização de imidazoquinolin(aminas) e seus derivados para tratamento intravesical de doenças da bexiga, tais como por exemplo, cancro da bexiga e cistite. Além disso, a presente invenção compreende métodos de tratamento para estas doenças, bem como métodos de administração das composições farmacêuticas da invenção.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO IMIDAZOQUINOLIN(AMINAS) E SEUS DERIVADOS ADEQUADAS PARA ADMINISTRAÇÃO LOCAL"

A presente invenção refere-se, em geral, ao campo de moduladores do sistema imunitário inato, em particular a composições farmacêuticas compreendendo imidazoquinolin(aminas) e seus derivados, de um modo preferido, adequadas para administração local, tal como administração intravesical. Além disso, a presente invenção refere-se à utilização de imidazoquinolin(aminas) e seus derivados para o tratamento intravesical de doenças da bexiga, tais como por exemplo, cancro da bexiga e cistite. Além disso, a presente invenção compreende métodos de tratamento para estas doenças bem como métodos de administração das composições farmacêuticas da invenção.

A indução e/ou melhoria das respostas imunológicas do sistema imunitário inato e, dependendo do tipo de desencadeador, do sistema imunitário adaptativo, desempenha um papel importante na medicina moderna no tratamento e prevenção de numerosas doenças. Para esse efeito são amplamente utilizadas na técnica composições imunomoduladoras que abordam um pequeno número de receptores, chamados receptores de reconhecimento de padrão. Estes receptores de reconhecimento de padrão reconhecem tipicamente padrões moleculares conservados que distinguem organismos estranhos, como vírus, bactérias, fungos e parasitas de células dos seus hospedeiros. Como conhecidos hoje em dia, os receptores de reconhecimento de padrão incluem, *inter alia*, os chamados membros da família do receptor de tipo Toll (TLR), a

primeira família de receptores de reconhecimento de padrão estudados em pormenor.

Os TLR são proteínas transmembranares que reconhecem ligandos do meio extracelular ou do lúmen de endossomas. Após ligação ao ligando, estes transduzem o sinal através de proteínas adaptadoras citoplasmáticas que levam ao desencadeamento de uma resposta de defesa do hospedeiro e ocasionam a produção de péptidos antimicrobianos, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, citocinas antivirais etc. Até à data, foram identificados pelo menos 10 membros dos receptores de tipo Toll (TLR 1-10) em humano e 13 (TLR 1-13) em ratinhos. Aqueles receptores de tipo Toll (TLR) em humanos incluem os TLR1-TLR2, os quais reconhecem Lipopéptidos de triacilo; os receptores de tipo Toll TLR1-TLR6, os quais reconhecem lipopéptidos de diacilo; o receptor de tipo Toll TLR2, o qual reconhece peptidoglicanos; o receptor de tipo Toll TLR3, o qual é conhecido por reconhecer dsARN, um produto viral; o receptor de tipo Toll TLR4, o qual tem o LPS (lipopolissacárido) de bactérias Gram-negativas como um ligando conhecido; o receptor de tipo Toll TLR5, o qual reconhece a(s) flagelina(s) bacteriana(s); os receptores de tipo Toll TLR7/8, cujos ligandos conhecidos compreendem imidazoquinolinas, análogos de guanossina e ssARN; o receptor de tipo Toll TLR9, o qual reconhece motivos CpG não metilados frequentemente presentes no genoma de bactérias, vírus e protozoários, mas não em vertebrados; o TLR9 reconhece adicionalmente a hemozoina do pigmento da malária, um produto de digestão da hemoglobina; Finalmente, foi demonstrado que o receptor de tipo Toll TLR10 se associa directamente com MyD88, o adaptador do domínio receptor de IL-1 do Toll comum (ver, e. g., Hasan et al., The Journal of Immunology, 2005, 174: 2942-2950). Após reconhecimentos dos agentes patogénicos

microbianos, estes TLR desencadeiam tipicamente vias de sinalização intracelulares que resultam na indução de citocinas inflamatórias (e. g., TNF-alfa, IL-6, IL-1-beta e IL-12), interferão de tipo I (IFN-beta e IFN-alfa múltiplos) e quimiocinas (Kawai, T. e S. Akira (2006). "TLR signalling." *Cell Death Differ* 13(5): 816-25).

Entre os TLR acima, os TLR3, TLR7 e TLR9 são da maior importância. O TLR7 reconhece modificadores imunológicos sintéticos pequenos incluindo imiquimod, R-848, loxoribina e bropirimina, os quais já são todos aplicados ou promissores para utilização clínica contra infecções virais e cânceros. Além disso, as células dendríticas plasmocitóides expressam TLR7 e TLR9, e respondem aos ligandos de TLR7 e TLR9 produzindo uma grande quantidade de interferão (IFN-alfa). Estes resultados indicam que os TLR3, TLR7 e TLR9 podem desempenhar um papel importante na detecção e combate de infecções virais.

Um exemplo particular de modificadores imunológicos como descritos acima inclui o imiquimod (na descrição que se segue também referido como R-837, TMX, TMX-101), o qual pertence à classe de modificadores imunológicos de imidazoquinolin(amina). Foi demonstrado que a molécula imunomoduladora imiquimod (1-isobutil-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-4-amina) tem eficácia clínica em doenças oncológicas, virais e inflamatórias. Julga-se que o mecanismo para a actividade imunoestimuladora do imiquimod seja devido em grande parte à melhoria da resposta imunológica por indução de várias citocinas importantes (e. g., interferões, interleucinas, factor de necrose tumoral, etc.). Mesmo que o mecanismo exacto de acção do imiquimod ainda não seja conhecido, a ligação do imiquimod ao receptor de tipo Toll 7 (TLR7) é visto como sendo um passo essencial na activação do sistema

imunitário. As células estimuladas por imiquimod via TLR-7 segregam citocinas (principalmente interferão- α (IFN- α), interleucina-6 (IL-6) e factor de necrose tumoral- α (TNF- α) contribuindo para as propriedades antivirais, antitumorais e anti-inflamatórias do agente.

Foi demonstrado que o imiquimod é um modulador imunológico potente actualmente utilizado como uma primeira linha de terapia tópica para verrugas genitais e carcinomas basocelulares superficiais (Purdon CH, Azzi CG, Zhang J, Smith EW, Maibach HI. Penetration enhancement of transdermal delivery-current permutations and limitations. Crit Rev Ther Drug Carriers Syst. 2004; 21: 97-132; Chang YC, Madkan V, Cook-Norris R, Sra K, Tyring S. Current and potential uses of imiquimod. South Med J. 2005; 98: 914-20; Wagstaff AJ, Perry CM. Topical imiquimod: a review of its use in the management of anogenital warts, actinic keratoses, basal cell carcinoma and other skin lesions. Drugs. 2007; 67: 2187-210). Além disso, o imiquimod foi utilizado para o tratamento de lesões malignas da pele incluindo melanoma e carcinoma basocelular (Wagstaff AJ, Perry CM. Topical imiquimod: a review of its use in the management of anogenital warts, actinic keratoses, basal cell carcinoma and other skin lesions. Drugs. 2007; 67: 2187-210). O imiquimod induz citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo* (Chan M, Hayashi T, Kuy CS et al. Synthesis and Immunological Characterization of Toll-Like Receptor 7 Agonistic Conjugates. Bioconjugate chemistry. 2009) que atraem células imunitárias para o sítio de administração local (Barnetson RS, Satchell A, Zhuang L, Slade HB, Halliday GM. Imiquimod induced regression of clinically diagnosed superficial basal cell carcinoma is associated with early infiltration by CD4 T cells and dendritic cells. Clinical and experimental dermatology, 2004; 29: 639-43).

Além disso, foi demonstrado que as imidazoquinolinas orientam os efeitos citotóxicos para as células do cancro da bexiga e induzem-nas a segregar citocinas pró-inflamatórias (Smith EB, Schwartz M, Kawamoto H *et al.* Antitumor effects of imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *The Journal of urology*. 2007; 177: 2347-51). É ainda descrito que as imidazoquinolinas têm efeitos antitumorais em modelos de cancro da bexiga em ratinhos ortotópicos (Smith EB, Schwartz M, Kawamoto H *et al.* Antitumor effects of imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *The Journal of urology*. 2007; 177: 2347-51).

Além disso, foi demonstrado que o TLR-7 é também expresso em linhas celulares de cancro da bexiga de murino e humano e que as imidazoquinolinas têm efeitos biológicos directos potentes nas células do carcinoma das células uroteliais diminuindo a viabilidade das células e induzindo a apoptose e produção de citocinas (Smith EB, Schwartz M, Kawamoto H, *et al.* Antitumour effects of Imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2007;177:2347). Os efeitos directos parecem ser o resultado da regulação negativa de c-Myc e podem entrar em sinergia com a acção imunomoduladora de imidazoquinolinas (Liu H, Schwartz MJ, Hwang DH, Scherr OS. Tumour growth inhibition by an imidazoquinoline is associated with c-Myc down-regulation in urothelial cell carcinoma. *BJU Int* 2008; 101 :894-901). Além disso, os resultados iniciais num modelo em ratinho ortotópico imunocompetente sugeriu efeitos antitumorais *in vivo* (Smith EB, Schwartz M, Kawamoto H, *et al.* Antitumour effects of Imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2007;177:2347; Liu H, Schwartz MJ, Hwang DH, Scherr OS. Tumour growth inhibition by an imidazoquinoline is associated with c-Myc down-regulation in urothelial cell carcinoma. *BJU Int*

2008; 101: 894-901). Consequentemente, as imidazoquinolinas têm potencial terapêutico como agente intravesical para o cancro da bexiga.

Embora sejam conhecidos alguns dos efeitos benéficos dos modificadores imunológicos, tal como o imiquimod, a aptidão para proporcionar benefício terapêutico através da administração local destes modificadores imunológicos para o tratamento de um estado particular numa localização particular pode ser impedida por uma variedade de factores. Estes factores incluem a insolubilidade e/ou degradação destes modificadores imunológicos na formulação antes, durante ou mesmo após a administração, mas também a instabilidade física da formulação, incluindo factores tais como a separação dos componentes, espessamento, precipitação/aglomeração dos ingredientes activos e semelhantes, bem como a má permeação dos modificador(es) imunológico(s) no tecido ou células circundantes após administração. Especificamente, a solubilidade do modificador imunológico imiquimod é crítica e a sua utilização em composições farmacêuticas, em particular, em composições líquidas ou semilíquidas é limitada devido às suas propriedades hidrófobas. Ainda que o imiquimod seja solúvel em concentrações baixas em solventes orgânicos polares, tais como DMSO, dimetilformamida e N-metil-2-pirrolidona, tais solventes não permitem a administração do imiquimod junto ou no corpo humano devido aos seus vários efeitos tóxicos. No entanto, os solventes não tóxicos, tal como a água ou etanol, solubilizam os membros das imidazoquinolin(amin)as, tal como o imiquimod, apenas ligeiramente e permitem apenas a administração de imiquimod sobre ou no corpo humano em concentrações baixas (subterapêuticas).

Consequentemente, há uma necessidade de proporcionar uma composição farmacêutica, particularmente como uma formulação líquida ou semilíquida, a qual permite solubilizar as imidazoquinolin(amin)as, tal como o imiquimod, de uma maneira apreciável e, por conseguinte, permite concentrações eficazes mais elevadas dos modificadores imunológicos, tal como o imiquimod, quando administradas ao indivíduo necessitada da mesma. Particularmente, há uma necessidade na técnica de proporcionar uma tal formulação líquida ou semilíquida para modos de administração local, que não exibam efeitos tóxicos mas apresentem solubilidade melhorada e, de um modo preferido, menor instabilidade física da formulação.

No entanto, a utilização de modificadores imunológicos, particularmente de membros da classe de imidazoquinolin(amin)as, tal como o imiquimod, para o tratamento de doenças oncológicas e virais é também limitada pelos seus vários efeitos secundários. e. g., está descrito que o imiquimod origina, por exemplo, agitação, anemia, angioedema, arritmias, síndrome de vazamento capilar, insuficiência cardíaca, cardiomiopatia, acidente cerebrovascular, depressão, dispneia, eritema multiforme, dermatite esfoliativa, síndrome púrpura de Henoch-Schönlein, trombocitopenia idiopática púrpura, insónia, isquemia, leucopenia, função anómala do fígado, linfoma, esclerose múltipla agravada, paresia, proteinúria, edema pulmonar, ataque apopléctico, síncope, trombocitopenia e tiroidite.

A fim de reduzir o risco desses efeitos secundários graves - os quais podem ser potencialmente fatais em alguns casos - actualmente aquele é essencialmente administrado por via local em vez de sistémica. Neste contexto, as vias para administração sistémica em geral incluem, por exemplo, as vias transdérmica,

oral ou parentérica, incluindo injeções subcutâneas, intravenosas, intramusculares, intra-arteriais, intradérmicas e intraperitoneais e/ou as vias de administração intranasal. Uma tal administração sistémica leva tipicamente a uma distribuição total dos modificadores imunológicos através do corpo humano e, por conseguinte, aumenta significativamente o risco de efeitos secundários. Em contraste, as vias para administração local em geral incluem, por exemplo, as vias de administração tópica mas também as intradérmicas, transdérmicas, injeções subcutâneas ou intramusculares ou intralesionais, intracranianas, intrapulmonares, intracardiacas, e injeções sublinguais, em que essa administração ocorre tipicamente no sítio de aflição e permite uma acção directa do fármaco enquanto os efeitos secundários sistémicos são significativamente reduzidos, que se prevê que ocorram após administração sistémica.

No contexto dos modificadores imunológicos como definidos acima, em particular imidazoquinolin(amin)as, tal como o imiquimod ou seus derivados, o requisito específico de administração local devido às propriedades físico-químicas acima mencionadas destes compostos e efeitos secundários após administração sistémica limita a sua aplicação terapêutica e o número de doenças a serem tratadas com os mesmos. Presentemente, a maioria das doenças, que podem ser tratadas com imiquimod ou seu derivados são doenças específicas da pele, incluindo cancros da pele, tais como carcinoma basocelular, doença de Bowen, carcinoma de células escamosas superficiais bem como verrugas genitais (Condilomas acuminados). Uma outra doença proeminente, a qual pode ser tratada com modificadores imunológicos, em particular imidazoquinolin(amin)as, tal como imiquimod, inclui as doenças da bexiga, em particular cancro da bexiga e cistite.

Neste contexto, cancro da bexiga refere-se a qualquer um dos vários tipos de doenças neoplásicas (malignas ou não malignas) da bexiga urinária. Este é um dos cancros de crescimento mais rápido em todo o mundo devido ao envelhecimento rápido das populações da maioria dos países. Em cada ano nos Estados Unidos mais de 60000 pessoas são diagnosticadas de novo com cancro da bexiga, 80% destas têm cancro da bexiga não invasivo. Uma vez que a taxa de mortalidade do cancro da bexiga é relativamente baixa, o número total de doentes nos EUA e na Europa é superior a 400000. Assim, o cancro da bexiga urinária é a quinta malignidade mais comum entre os homens na sociedade Ocidental. A maioria dos casos de cancro da bexiga, são diagnosticados como tumores superficiais, não invasivos que são potencialmente curáveis por cirurgia e imunoterapia (Schenk-Braat EA, Bangma CH. Immunotherapy for superficial bladder cancer. Cancer Immunol Immunother. 2005; 54: 414-23).

Até agora a maioria dos doentes com cancro da bexiga não invasivo (superficial) são tratados com as chamadas "soluções de bacillus Calmette-Guerin (BCG)", as quais são administrada através da via intravesical. No entanto, tais soluções de BCG são produtos não caracterizados constituídos por uma forma atenuada da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e, por conseguinte, exibindo um perfil de segurança fraco.

Além disso, os tumores que crescem superficialmente podem ser removidos por ressecção transuretral, mas a taxa de recorrência é elevada. Para prolongar os intervalos sem tumor após ressecção cirúrgica, o tratamento intravesical com *Mycobacterium bovis* Baccilus-Calmette-Guerin (BCG), a estirpe de vacina contra a infecção por tuberculose, é actualmente utilizada como uma opção de tratamento adjuvante (Alexandroff

AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet*. 1999; 353: 1689-94. De Jager R, Guinan P, Lamm D et al. Long-term complete remission in bladder carcinoma in situ with intravesical TICE bacillus Calmette Guerin. Overview analysis of six phase II clinical trials. *Urology*. 1991; 38: 507-13. Totterman TH, Loskog A, Essand M. The immunotherapy of prostate and bladder cancer. *BJU international*. 2005; 96: 728-35.)

No entanto, o tratamento de *M. bovis* BCG induz inflamação local não específica na bexiga acompanhada de várias citocinas (IL-2, IL-6, IL-8 e TNF α) (De Boer EC, Rooijackers SJ, Schamhart DH, Kurth KH. Cytokine gene expression in a mouse model: the first instillations with viable bacillus Calmette-Guerin determine the succeeding Th1 response. *The Journal of urology*. 2003; 170:2004-8) e quimiocinas que por sua vez iniciam a infiltração de células imunitárias no urotélio da bexiga (Suttmann H, Riemensberger J, Bentien G et al. Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer research*. 2006; 66: 8250-7. Simons MP, O'Donnell MA, Griffith TS. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urologic oncology*. 2008; 26: 341-5). A instilação de BCG provoca estimulação não específica do sistema imunitário, a qual induz infiltração local da parede da bexiga por células T activadas derivadas de imorção mediada por células (Bohle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *The Journal of urology*. 2003; 170: 964-9).

A incidência de carcinoma de células uroteliais invasivas de não-músculo da bexiga (NMIBC) é elevado (Babjuk M, Oosterlinck W, Silvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J; European Association of Urology (EAU). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. Eur Urol 2008;54:303-14) e a prevalência é ainda maior devido à elevada taxa de recorrência após ressecção transuretral primária. Em doentes em elevado risco de recorrência e/ou progressão do tumor para doença invasiva de músculo, é indicada imunoterapia intravesical com BCG durante pelo menos um ano (Babjuk M, Oosterlinck W, Silvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J; European Association of Urology (EAU). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. Eur Urol 2008;54:303-14). No entanto, a BCG é apenas parcialmente eficaz e podem ocorrer efeitos secundários locais e sistémicos graves (Witjes JA, Palou J, Soloway M, Lamm O, Brausi M, Spermon JR, Persad R, Buckley R, Akaza H, Colombel M, Böhle A. Clinical Practice recommendations for the prevention and management of intravesical therapy-associated adverse events. Eur. Urol Suppl. 2008;7:667-74). Consequentemente, o desenvolvimento de novas opções de tratamento intravesical para diminuir a recorrência e progressão de tumor de NMIBC permanece essencial.

Como uma outra doença da bexiga, a cistite compreende tipicamente uma inflamação da bexiga urinária e ocorre quando o aparelho urinário inferior (uretra e bexiga) normalmente estéril é infectado por bactérias e torna-se irritado e inflamado. Devido ao risco da infecção se espalhar aos rins e devido à elevada taxa de complicação na população mais idosa e em diabéticos, é quase sempre recomendado tratamento imediato. A fim de controlar, a infecção bacteriana cistite é geralmente tratada com antibióticos. Os antibióticos geralmente utilizados

para o tratamento incluem, por exemplo, nitrofurantoína, trimetoprim-sulfametoxazole, amoxicilina, cefalosporinas, ciprofloxacina ou levofloxacina, e doxiciclina. No entanto, tais terapias de antibiótico rompem frequentemente o equilíbrio normal da flora intestinal provocando diarreia. Além disso, pode também ocorrer uma ruptura induzida pelo antibiótico da população de bactérias normalmente presente como constituintes da flora vaginal normal e pode levar ao crescimento excessivo de espécies de levedura do género *Candida* na área vulvovaginal.

Para tais doenças, em particular para o tratamento de doenças da bexiga tais como cancro não invasivo e/ou cistite seria desejável a disponibilização de um agente alternativo que actue através de uma activação do sistema imunitário. No entanto, ainda que possam ser utilizados modificadores imunológicos como definidos acima, particularmente imiquimod ou seu derivados, para o tratamento destas doenças, a administração pode ser dificultada por efeitos secundários graves após administração sistémica como explicado acima. Além disso, quando administrados localmente, esses modificadores imunológicos, particularmente imiquimod ou seus derivados, tipicamente não estão presentes numa quantidade terapêuticamente eficaz *in vivo* devido às suas propriedades físico-químicas (farmaceuticamente desafiadoras). Tais composições farmacêuticas não foram ainda descritas na técnica, o que indica o desafio excepcional que representam na técnica. Como conhecido para um especialista, para proporcionar uma tal composição farmacêutica específica têm de ser considerados vários aspectos farmacêuticos, tais como a dose, compatibilidade do excipiente, solubilidade, estabilidade, fabrico estéril, praticabilidade do aumento de escala, administração com cateter, custos e adesão do doente, bem como aspectos farmacológicos, tais como actividade biológica,

permeabilidade da membrana, duração do efeito, baixa circulação sistémica (a fim de evitar os efeitos secundários sistémicos) e perfil de toxicidade. Tal como para muitos outros agentes activos, a disponibilização de composições farmacêuticas compreendendo o agente activo desejado e a libertação do agente de forma que seja garantida a libertação local do fármaco é um dos principais desafios para cada farmacêutico. Além disso, as propriedades físico-químicas (críticas) *e. g.*, das imidazoquinolin(aminas), em particular o perfil de hidrofobicidade desta classe de compostos, têm de ser tidas em consideração, o que (face às abordagens descritas na técnica) leva tipicamente a uma concentração insuficiente *in vivo* do composto modificador imunológico administrado que actua como ligando de TLR-7.

Consequentemente, existe uma necessidade urgente para proporcionar uma composição farmacêutica adequada para administração local específica de modificadores imunológicos como definidos acima, em particular de imiquimod ou seus derivados, para o tratamento de doenças da bexiga, *e. g.*, através de uma via de administração intravesical.

Em resumo, como delineado acima, o imiquimod é um agente activo eficiente para o tratamento de doenças oncológicas, virais e inflamatórias. No entanto, a utilização de imidazoquinolin(amin)as, tais como imiquimod e seus derivados, no fabrico de um medicamento está grandemente limitada pelas suas características de solubilidade. Além disso, vários efeitos secundários são provocados por imidazoquinolin(amin)as, tal como o imiquimod, se administrados sistemicamente. Consequentemente, a administração deste agente numa formulação que permita que o agente seja especificamente fornecido ao órgão alvo utilizando

uma composição apropriada farmacêutica é da maior importância. Consequentemente, seria altamente desejável proporcionar composições farmacêuticas específicas compreendendo imidazoquinolin(amin)as, tal como imiquimod, em quantidades suficientemente solubilizadas para permitir o tratamento eficaz das doenças aqui mencionadas. Além disso, seria preferido, se as imidazoquinolin(amin)as, tal como o imiquimod e seus derivados, fossem formuladas numa formulação adequada para ser administrada localmente, em particular, por via intravesical, para combater doenças da bexiga, reduzindo, desse modo, significativamente o risco de efeitos secundários sistêmicos graves.

Assim, de acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, a composição farmacêutica compreende uma imidazoquinolin(amina) e ácido láctico para serem utilizados num método de tratamento de doenças da bexiga de acordo com a reivindicação 1.

Para algumas formas de realização aplicam-se uma ou mais das seguintes condições:

- são excluídas composições farmacêuticas para aplicação tópica,
- são excluídas composições farmacêuticas compreendendo óleo,
- são excluídas composições farmacêuticas formuladas como uma formulação de a/o (água em óleo) ou o/a (óleo em água),
- são excluídas composições farmacêuticas formuladas como um creme compreendendo 4% em peso por peso de imiquimod (1-isobutil-1 H-imidazo[4,5-c]-quinolin-4-amina) na fase

oleosa e 1% em peso por peso de ácido láctico (85%) na fase aquosa,

- são excluídas composições farmacêuticas para administração parentérica,
- são excluídas composições farmacêuticas compreendendo glicerina e/ou sorbitol,
- são excluídas composições farmacêuticas para administração parentérica compreendendo 1% em peso por peso de 1-isobutil-1H-imidazo[4,5-c]-quinolin-4-amina e/ou 1% em peso por peso de 1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina ou N-[4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]metanossulfonaamida e 1% ou 2% em peso por peso de ácido láctico (85%) ou 0,6% em peso por peso de ácido acético,
- são excluídas composições farmacêuticas compreendendo ácido acético e miristato e monooleato de sorbitano 20 ou miristato de isopropilo, e/ou
- são excluídas composições farmacêuticas compreendendo nanopartículas de imiquimod quitosano obtidas misturando solução de quitosano ácido acético com imiquimod.

De acordo com outra forma de realização preferida da presente invenção, a composição farmacêutica compreende ainda pelo menos um agente termossensível, em que o, pelo menos, um agente termossensível é, de um modo preferido, seleccionado de quitosano ou seus derivados, ou de um copolímero de poli(óxido

de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (também designado PEO-PPO-PEO ou poloxâmero).

De acordo com uma outra forma de realização preferida da presente invenção, o, pelo menos, um agente termossensível é seleccionado de quitosano ou seus derivados, ou de um copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (também designado PEO-PPO-PEO ou poloxâmero) incluindo Pluronic F 108 Cast Solid Surfacta; Pluronic F 108 Pastille; Pluronic F 108 Prill; Pluronic F 108NF Prill (Poloxâmero 338); Pluronic F 127; Pluronic F 127 Prill; Pluronic F 127 NF; Pluronic F 127 NF 500 BHT Prill; Pluronic F 127 NF Prill (Poloxâmero 407); Pluronic F 38; Pluronic F 38 Pastille; Pluronic F 68; Pluronic F 68 Pastille; Pluronic F 68 LF Pastille; Pluronic F 68 NF Prill (Poloxâmero 188); Pluronic F 68 Prill; Pluronic F 77; Pluronic F 77 Micropastille; Pluronic F 87; Pluronic F 87 NF Prill (Poloxâmero 237); Pluronic F 87 Prill; Pluronic F 88 Pastille; Pluronic F 88 Prill; Pluronic F 98; Pluronic F 98 Prill; Pluronic L 10; Pluronic L 101; Pluronic L 121; Pluronic L 31; Pluronic L 35; Pluronic L 43; Pluronic L 44; Pluronic L 44 NF (Poloxâmero 124); Pluronic L 61; Pluronic L 62; Pluronic L 62 LF; Pluronic L 62D; Pluronic L 64; Pluronic L 81; Pluronic L 92; Pluronic L44 NF INH Surfactant (Poloxâmero 124); Pluronic N 3; Pluronic P 103; Pluronic P 104; Pluronic P 105; Pluronic P 123 Surfactant; Pluronic P 65; Pluronic P 84; Pluronic P 85; e Poloxâmero 403, ou é seleccionado de uma mistura formada por quaisquer dois ou mais dos agentes termossensíveis anteriormente definidos.

De acordo com uma outra forma de realização preferida da presente invenção, o, pelo menos, um agente termossensível é seleccionado de um copolímero de poli(óxido de etileno)-

poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (também designado PEO-PPO-PEO ou poloxâmero) incluindo Pluronic F 108 Cast Solid Surfacta; Pluronic F 108 Pastille; Pluronic F 108 Prill; Pluronic F 108NF Prill (Poloxâmero 338); Pluronic F 127; Pluronic F 127 Prill; Pluronic F 127 NF; Pluronic F 127 NF 500 BHT Prill; Pluronic F 127 NF Prill (Poloxâmero 407); Pluronic F 38; Pluronic F 38 Pastille; Pluronic F 68; Pluronic F 68 Pastille; Pluronic F 68 LF Pastille; Pluronic F 68 NF Prill (Poloxâmero 188); Pluronic F 68 Prill; Pluronic F 77; Pluronic F 77 Micropastille; Pluronic F 87; Pluronic F 87 NF Prill (Poloxâmero 237); Pluronic F 87 Prill; Pluronic F 88 Pastille; Pluronic F 88 Prill; Pluronic F 98; Pluronic F 98 Prill; Pluronic L 10; Pluronic L 101; Pluronic L 121; Pluronic L 31; Pluronic L 35; Pluronic L 43; Pluronic L 44; Pluronic L 44 NF (Poloxâmero 124); Pluronic L 61; Pluronic L 62; Pluronic L 62 LF; Pluronic L 62D; Pluronic L 64; Pluronic L 81; Pluronic L 92; Pluronic L44 NF INH Surfactant (Poloxâmero 124); Pluronic N 3; Pluronic P 103; Pluronic P 104; Pluronic P 105; Pluronic P 123 Surfactant; Pluronic P 65; Pluronic P 84; Pluronic P 85; e Poloxâmero 403, ou é selecionado de uma mistura formada por quaisquer dois ou mais dos agentes termossensíveis anteriormente definidos.

No contexto da presente invenção, a composição farmacêutica da invenção compreende como um primeiro componente um ácido orgânico selecionado de ácido láctico. Embora os ácidos orgânicos " ácido acético " e " ácido láctico " fossem já conhecidos de um especialista para a formulação de composições farmacêuticas em geral, a requerente da presente invenção determinou surpreendentemente que especificamente estes ácidos carboxílicos de cadeia curta são adequados para solubilizar eficazmente imidazoquinolin(amin)a ou seus derivados, uma

observação que ainda não tinha sido publicada ou discutida na técnica. Além disso, verificou-se que o ácido acético e o ácido láctico exibem propriedades de solubilização claramente superiores a qualquer outro ácido (carboxílico). Mais especificamente e ainda mais surpreendentemente, o ácido acético (CH_3COOH) e/ou o ácido láctico (ácido 2-hidroxi-propiónico), solubilizam a imidazoquinolin(amina) 3 a 100 vezes melhor do que outros ácidos (carboxílicos) de cadeia curta, nomeadamente, ácido fosfórico, ácido succínico e ácido cítrico.

Estes efeitos surpreendentes são, sem se estar limitado a qualquer teoria, particularmente devidos à estrutura específica das imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados como aqui utilizados, e. g., imiquimod, e à interação específica de, especificamente, ácido acético e ácido láctico com o composto de imidazoquinolin(amina), que leva a uma estrutura de aducto inesperada. O termo "imidazoquinolin(amin)as" refere-se à classe genérica de imidazoquinolinas e, mais especificamente numa forma de realização preferida, também à subclasse de imidazoquinolinaminas.

Uma vez que as imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados como aqui utilizados têm um grupo funcional básico, particularmente uma porção amina, foi assumido na literatura da técnica anterior que as imidazoquinolin(aminas) podem ser solubilizadas em qualquer solução ácida a valores de pH abaixo do pK_a dos compostos dessa classe, e. g., no caso de imiquimod, i. e., de cerca de 4. No entanto, foi demonstrado pela requerente da presente invenção que a solubilidade de imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados como aqui utilizados não dependia apenas do pH da solução. Sem se estar limitado por qualquer teoria, aquelas propriedades superiores parecem ser

concretizadas por uma interacção que ocorre entre as imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados como aqui utilizados e o ácido (orgânico) especificamente seleccionado de ácido acético e/ou ácido láctico, formando, desse modo, produtos de adição específicos entre ambos os componentes. Evidentemente, nenhuma interacção desse tipo parece ocorrer entre as imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados como aqui utilizados e qualquer outro ácido (orgânico). Consequentemente, assume-se, que os resultados surpreendentes, particularmente as características de solubilização superiores específicas das imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados como aqui utilizados nos ácidos orgânicos ácido acético e/ou ácido láctico, parecem depender das propriedades estruturais específicas que são exclusivamente realizadas pelo ácido láctico e acético mas não por qualquer outro ácido (orgânico). Desse modo, o ácido láctico e/ou acético formam o anião na estrutura de aducto, sendo as imidazoquinolin(amin)as os catiões carregados positivamente.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, a composição farmacêutica da invenção como definida acima compreende um ácido orgânico seleccionado de ácido láctico numa concentração de cerca de 0,025 M a cerca de 0,200 M, de um modo preferido, numa concentração de cerca de 0,025 M a cerca de 0,100 M ou numa concentração de cerca de 0,100 M a cerca de 0,200 M, ou numa concentração de cerca de 0,075 M a cerca de 0,125 M, e. g., numa concentração de cerca de 0,025 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,030 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,035 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,040 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,045 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,050 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,055 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,060 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,065 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,070 M a cerca de

0,200 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,080 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,085 a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,090 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,095 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,095 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,100 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,125 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,130 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,135 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,140 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,145 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,0150 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,155 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,160 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,165 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,170 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,175 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,180 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,185 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,190 M a cerca de 0,200 M ou cerca de 0,195 M a cerca de 0,200 M, ou de um modo preferido, numa concentração de cerca de 0,050 M a cerca de 0,100 M, e. g., numa concentração de cerca de 0,055 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,060 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,065 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,070 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,080 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,085 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,090 M a cerca de 0,100 M, ou de cerca de 0,095 M a cerca de 0,100 M, ou numa concentração de cerca de 0,025 M a cerca de 0,100 M, e. g., numa concentração de cerca de 0,025 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,030 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,035 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,040 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,045 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,050 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,055 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,060 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,065 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,070 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,080 M a cerca de 0,100 M, de cerca de

0,085 a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,090 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,095 M a cerca de 0,100 M, de cerca de 0,095 M a cerca de 0,100 M, ou numa concentração de cerca de 0,100 M a cerca de 0,200 M, e. g., numa concentração de cerca de 0,100 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,125 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,130 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,135 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,140 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,145 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,0150 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,155 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,160 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,165 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,170 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,175 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,180 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,185 M a cerca de 0,200 M, de cerca de 0,190 M a cerca de 0,200 M, ou cerca de 0,195 M a cerca de 0,200 M, ou numa concentração de cerca de 0,075 M a cerca de 0,125 M, e. g. de cerca de 0,08 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,085 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,09 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,095 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,1 M a cerca de 0,125 M, ou de cerca de 0,075 M a cerca de 0,120 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,115 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,110 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,105 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,105 M ou de cerca de 0,08 M a cerca de 0,120 M, e. g. de cerca de 0,085 M a cerca de 0,115 M, de cerca de 0,09 M a cerca de 0,110 M, de cerca de 0,095 M a cerca de 0,105 M, ou de cerca de 0,1 M. Neste contexto, foi demonstrado que a quantidade de imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados, como aqui utilizados, solubilizada na solução está directamente relacionada com a concentração de ácido, i. e., à concentração de ácido láctico. Consequentemente, concentrações mais elevadas de ácido láctico podem ser preferidas para solubilizar, de um modo preferido, nas gamas definidas acima.

A composição farmacêutica pode compreender apenas ácido láctico como o componente de ácido orgânico, contudo, pode ser incluído, pelo menos, um ácido inorgânico adicional na composição farmacêutica da invenção, e. g., ácido fosfórico, HCl etc.

De acordo com outra forma de realização específica da presente invenção, a composição farmacêutica da invenção como aqui definida compreende exclusivamente ácido láctico como componente ácida, apresentando, de um modo preferido, uma concentração de ácido láctico como definida acima para a composição farmacêutica da invenção em geral de cerca de 0,025 M a cerca de 0,200 M ou de cerca de 0,075 M a cerca de 0,125 M ou qualquer outra concentração como definida acima. Nesta forma de realização específica é ainda mais preferido, que a composição farmacêutica da invenção como descrita acima não inclua qualquer outro ácido além do ácido láctico, seja ele um ácido orgânico ou inorgânico. Neste contexto, a requerente da presente invenção determinou surpreendentemente que o ácido láctico é ainda mais eficiente na solubilização das imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados como aqui utilizados do que o ácido acético. Surpreendentemente, o ácido láctico é duas vezes mais eficiente na solubilização das imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados, como aqui utilizados, que o ácido acético. Foi também determinado, que a solubilidade das imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados, como aqui utilizados, em ácido láctico não é melhorada pela adição de tensioactivos, tal como Tween ou Pluronic, os quais actuam geralmente como intensificadores da solubilidade nas composições farmacêuticas. Esta observação sugere que as imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados, como aqui utilizados, não são retidos nas micelas formadas pelos tensioactivos e, por conseguinte, apoia a hipótese de que estas

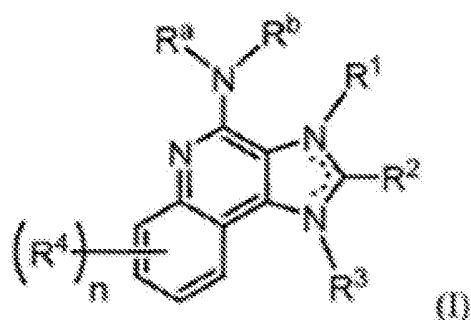
imidazoquinolin(aminas) interagem com ácido láctico formando aductos especificamente estruturados.

De acordo com outra forma de realização específica da presente invenção, a composição farmacêutica da invenção como aqui definida compreende ácido láctico numa concentração de cerca de 0,075 M a cerca de 0,125 M, e. g. de cerca de 0,08 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,085 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,09 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,095 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,1 M a cerca de 0,125 M, ou de cerca de 0,075 M a cerca de 0,120 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,115 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,110 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,105 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,105 M ou de cerca de 0,08 M a cerca de 0,120 M, e. g. de cerca de 0,085 M a cerca de 0,115 M, de cerca de 0,09 M a cerca de 0,110 M, de cerca de 0,095 M a cerca de 0,105 M ou de cerca de 0,1 M.

De acordo com uma outra forma de realização específica da presente invenção, a composição farmacêutica da invenção como aqui definida compreende tipicamente um valor de pH de cerca de 3 a cerca de 8, de um modo preferido, de cerca de 3 a cerca de 7, de um modo mais preferido, de cerca de 3 a cerca de 6, de um modo ainda mais preferido, de cerca de 3 a cerca de 5, e de um modo muito preferido, um valor de pH de cerca de 3,5 a cerca de 4, incluindo um valor de pH numa gama de cerca de 3,5 a cerca de 4,9, de cerca de 3,5 a cerca de 4,8, de cerca de 3,6 a cerca de 4,7, de cerca de 3,6 a cerca de 4,6, de cerca de 3,7 a cerca de 4,5, de cerca de 3,7 a cerca de 4,4, de cerca de 3,8 a cerca de 4,3, de cerca de 3,8 a cerca de 4,2, ou de cerca de 3,9 a cerca de 4,1. A composição farmacêutica da invenção pode ser preparada e administrada num valor de pH como definido acima. Se for

necessário, o valor de pH pode ser ainda ajustado aos requisitos de tratamento e administração específicos, e. g., a um valor de pH mais neutro de cerca de 5, 6 ou 7 (pH 5 a 7), e. g., utilizando tampões e aditivos como aqui divulgados.

De acordo com uma forma de realização particular, a composição farmacêutica da invenção compreende imidazoquinolin(aminas) seleccionadas da fórmula (I) seguinte:



em que

R^1 , R^2 e R^3 são, cada, independentemente seleccionados de hidrogénio; alquilo cíclico de três, quatro ou cinco átomos de carbono; alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo um a cerca de dez átomos de carbono e alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada substituído contendo um a cerca de dez átomos de carbono, em que o substituinte é seleccionado do grupo consistindo de cicloalquilo contendo três a cerca de seis átomos de carbono e cicloalquilo contendo três a cerca de seis átomos de carbono substituídos com alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo um a cerca

de quatro átomos de carbono; fluoro- ou cloroalquilo contendo desde um a cerca de dez átomos de carbono e um ou mais átomos de flúor ou cloro; alcenilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo dois a cerca de dez átomos de carbono e alcenilo de cadeia linear ou cadeia ramificada substituído contendo dois a cerca de dez átomos de carbono, em que o substituinte é seleccionado do grupo consistindo de cicloalquilo contendo três a cerca de seis átomos de carbono e cicloalquilo contendo três a cerca de seis átomos de carbono substituídos com alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo um a cerca de quatro átomos de carbono; hidroxialquilo de um a cerca de seis átomos de carbono; alcoxialquilo em que a porção alcoxilo contém um a cerca de quatro átomos de carbono e a porção alquilo contém um a cerca de seis átomos de carbono; aciloxialquilo em que a porção aciloxilo é alcanoiloxilo de dois a cerca de quatro átomos de carbono ou benzoiloxilo, e a porção alquilo contém um a cerca de seis átomos de carbono, com a condição de que qualquer um desses grupos alquilo, alquilo substituído, alcenilo, alcenilo substituído, hidroxialquilo, alcoxialquilo ou aciloxialquilo não possuam um carbono átomo de carbono completamente substituído ligado directamente ao átomo de azoto; benzilo; (fenil)etilo; e fenilo; estando o referido substituinte benzilo, (fenil)etilo ou fenilo opcionalmente substituído no anel benzeno com uma ou duas porções independentemente seleccionadas

do grupo consistindo de alquilo de um a cerca de quatro átomos de carbono, alcoxilo de um a cerca de quatro átomos de carbono e halogéneo, com a condição de que quando o referido anel benzeno está substituído com duas das referidas porções, então as porções em conjunto contêm não mais do que seis átomos de carbono;

-CHR_xR_y, em que R_y é hidrogénio ou uma ligação carbono-carbono, com a condição de que quando R_y é hidrogénio R_x é alcoxilo de um a cerca de quatro átomos de carbono, hidroxialcoxilo de um a cerca de quatro átomos de carbono, 1-alcinilo de dois a cerca de dez átomos de carbono, tetra-hidropiraniilo, alcoxialquilo em que a porção alcoxilo contém um a cerca de quatro átomos de carbono e a porção alquilo contém um a cerca de quatro átomos de carbono, 2-, 3- ou 4-piridilo, e com a condição adicional de que quando R_y é uma ligação carbono-carbono R_y e R_x em conjunto formam um grupo tetra-hidrofuranilo opcionalmente substituído com um ou mais substituintes independentemente seleccionados do grupo consistindo de hidroxilo ou hidroxialquilo de um a cerca de quatro átomos de carbono;

alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo um a cerca de oito átomos de carbono, hidroxialquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo um a cerca de seis átomos de carbono, morfolinometilo, benzilo, (fenil)etilo e fenilo, estando o substituinte benzilo,

(fenil)etilo ou fenilo opcionalmente substituído no anel benzeno com uma porção seleccionada do grupo consistindo de metilo, metoxilo ou halogéneo;

$-C(R_S)(R_T)(X)$ em que R_S e R_T são independentemente seleccionados do grupo consistindo de hidrogénio, alquilo de um a cerca de quatro átomos de carbono, fenilo e fenilo substituído em que o substituinte é seleccionado do grupo consistindo de alquilo de um a cerca de quatro átomos de carbono, alcoxilo de um a cerca de quatro átomos de carbono e halogéneo;

X é alcoxilo contendo um a cerca de quatro átomos de carbono, alcoxialquilo em que a porção alcoxilo contém um a cerca de quatro átomos de carbono e a porção alquilo contém um a cerca de quatro átomos de carbono, haloalquilo de um a cerca de quatro átomos de carbono, alquilamido em que o grupo alquilo contém um a cerca de quatro átomos de carbono, amino, amino substituído em que o substituinte é alquilo ou hidroxialquilo de um a cerca de quatro átomos de carbono, azido, alquiltio de um a cerca de quatro átomos de carbono, ou morfolinoalquilo em que a porção alquilo contém um a cerca de quatro átomos de carbono;

R^4 é hidrogénio, alquilo C_{1-8} , alcoxilo C_{1-8} , ou halo;

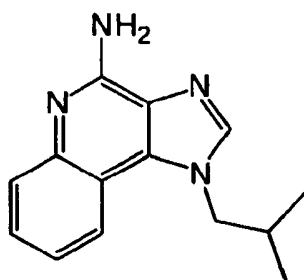
n é 1, 2, 3 ou 4;

R^a e R^b são, cada, independentemente hidrogénio, alquilo(C_1-C_6), hidroxiálquilo(C_1-C_6), aminoalquilo(C_1-C_6), aminossulfonilo, alcanóilo(C_1-C_6), arilo ou benzilo, estando todos eles opcionalmente substituídos com um ou mais grupos amino; ou R^a e R^b em conjunto com o azoto ao qual estão ligados formam um grupo pirrolidino, piperidino ou morfolino; as linhas a tracejado no anel de cinco membros de fórmula (I) acima denotam uma ligação opcional que liga um azoto do anel de cinco membros ao carbono que está entre os dois azotos do anel de cinco membros, e quando a ligação está presente, R^1 ou R^3 está ausente;

na condição de que R^a e R^b em conjunto permitam formar um ião amónio quaternário no azoto do elemento estrutural central $N(R^a)(R^b)$ ou por qualquer ião amónio quaternário que é proporcionado por R^a e/ou R^b ;

ou um seu sal farmacêuticamente aceitável. Um sal farmacêuticamente aceitável no significado da presente invenção refere-se tipicamente a um sal de ácido láctico.

De acordo com uma forma de realização, a composição farmacêutica da invenção compreende como imidazoquinolin(amina) o composto específico imiquimod, possuindo de um modo preferido, a fórmula específica 1-isobutil-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-4-amina, de um modo ainda mais preferido, compreendendo a seguinte estrutura específica:



(X)

De acordo com uma forma de realização, a composição farmacêutica da invenção compreende como imidazoquinolin(amina) o composto específico 1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina.

No contexto de imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados, como definidos acima, podem aplicar-se de um modo preferido, as seguintes definições adicionais:

- Nas fórmulas contendo o número inteiro n e em que n pode ser zero, um ou dois, n é, de um modo preferido, zero ou um.
- Os substituintes R₁₁-R₁₇ acima são geralmente aqui designados "1-substituintes". Numa forma de realização, os 1-substituintes são de um modo preferido, alquilo contendo um a seis átomos de carbono e hidroxialquilo contendo um a seis átomos de carbono, e.g., o 1-substituinte é 2-metilpropilo ou 2-hidroxi-2-metilpropilo.
- Os substituintes R₂₁-R₂₇ acima são aqui geralmente designados "2-substituintes". Numa forma de realização, os 2-substituintes são de um modo preferido, hidrogénio, alquilo de um a seis átomos de carbono, alcóxialquilo em que a porção alcóxilo contém um a

quatro átomos de carbono e a porção alquilo contém um a quatro átomos de carbono, e hidroxialquilo de um a quatro átomos de carbono, e. g., o 2-substituinte é hidrogénio, metilo, butilo, hidroximetilo, etoximetilo ou metoxietilo.

- O termo "alquilo" inclui, de um modo preferido, grupos alquilo C₁₋₁₀ lineares ou ramificados, e. g., metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, 1-metilpropilo, 3-metilbutilo, hexilo e semelhantes.
- A expressão "alquilo inferior" inclui, de um modo preferido, grupos alquilo C₁₋₆ lineares ou ramificados, e. g., metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1dimetiletilo, pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 2,2-dimetilpropilo e semelhantes.
- O termo "alquileno" refere-se, de um modo preferido, a um hidrocarboneto bivalente de cadeia linear ou ramificada (e. g., etileno -CH₂-CH₂-).
- O termo "cicloalquilo C₃₋₇" inclui, de um modo preferido, grupos, tais como ciclopropilo, ciclopentilo, ciclo-hexilo, ciclo-heptilo e semelhantes, e grupo cicloalquilo C₃₋₇ substituído com alquilo, de um modo preferido, grupo alquilo C₁₋₆ linear ou ramificado, tal como metilo, etilo, propilo, butilo ou pentilo, e grupo cicloalquilo C₅₋₇ tal como ciclopentilo ou ciclo-hexilo, e semelhantes.

- A expressão "alcoxilo inferior" inclui, de um modo preferido, grupos alcoxilo C_{1-6} , tal como metoxilo, etoxilo ou propoxilo, e semelhantes.
- A expressão "alcanoílo inferior" inclui, de um modo preferido, grupos alcanoílo C_{1-6} , tais como formilo, acetilo, propanoílo, butanoílo, pentanoílo ou hexanoílo, e semelhantes.
- A expressão "aroílo C_{7-11} " inclui grupos, tais como benzoílo ou naftoílo;
- A expressão "alcoxicarbonilo inferior" inclui, de um modo preferido, grupos alcoxicarbonilo C_{2-7} , tal como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo ou propoxicarbonilo, e semelhantes.
- A expressão "grupo alquilamino inferior" significa, de um modo preferido, um grupo amino substituído com grupo alquilo C_{1-6} , tal como metilamino, etilamino, propilamino, butilamino e semelhantes.
- A expressão "grupo di(alquil inferior)amino" significa, de um modo preferido, um grupo amino substituído com grupos iguais ou diferentes e grupo alquilo C_{1-6} (e. g., dimetilamino, dietilamino, etilmetilamino).
- A expressão "grupo alquilcarbamoílo inferior" significa, de um modo preferido, um grupo carbamoílo substituído com grupo alquilo C_{1-6} (e. g., metilcarbamoílo, etilcarbamoílo, propilcarbamoílo, butilcarbamoílo).

- A expressão termo "grupo di(alquil inferior)carbamoílo" significa, de um modo preferido, um grupo carbamoílo substituído com grupos iguais ou diferentes e grupo alquilo C_{1-6} (e. g., dimetilcarbamoílo, dietilcarbamoílo, etilmetilcarbamoílo).
- A expressão "átomo de halogéneo" como aqui definido significa, de um modo preferido, um átomo de halogéneo tais como átomo de flúor, átomo de cloro, átomo de bromo ou átomo de iodo.
- O termo "arilo" como aqui definido refere-se, de um modo preferido, a um grupo arilo monocíclico ou cíclico fundido C_{6-10} , tais como fenilo, indenilo ou naftilo, e semelhantes.
- O termo "heterocíclico" como aqui definido refere-se, de um modo preferido, a grupos heterocíclicos monocíclicos saturados ou grupo heterocíclico monocíclico ou fundido insaturado contendo, pelo menos, um heteroátomo, e. g., 0-3 átomos de azoto, 0-1 átomo de oxigénio (-O-) e 0-1 átomos de enxofre (-S-). Neste contexto, os exemplos não limitativos de grupo heterocíclico monocíclico saturado inclui grupo heterocíclico de 5 ou 6 membros saturado, tais como tetra-hidrofuranilo, pirrolidinilo, morfolinilo, piperidilo, piperazinilo ou pirazolidinilo. Os exemplos não limitativos de grupo heterocíclico monocíclico insaturado incluem grupo heterocíclico de 5 ou 6 membros insaturados, tais como furilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, tienilo, piridilo ou pirimidinilo. Os exemplos não limitativos de grupos heterocíclico fundido insaturado incluem grupo

heterocíclico bicíclico insaturado, tais como indolilo, isoindolilo, quinolilo, benzotiazolilo, cromanilo, benzofuranilo e semelhantes.

- Além disso, os grupos alquilo, arilo e heterocíclicos como aqui definidos podem estar opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes, em que os substituintes são iguais ou diferentes, e incluem alquilo inferior; alcoxilo C_{1-6} , tais como metoxilo, etoxilo ou propoxilo; carboxilo; alcoxicarbonilo C_{2-7} , tal como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo ou propoxicarbonilo) e halogéneo; cicloalquilo e incluem cicloalquilo C_{3-6} ; hidroxilo; alcoxilo C_{1-6} ; amino; ciano; arilo; arilo substituído, tal como 4-hidroxifenilo, 4-metoxifenilo, 4-clorofenilo ou 3,4-diclorofenilo; nitro e halogéneo, hidroxilo; hidroxi-alquilenos C_{1-6} , tal como hidroximetilo, 2-hidroxietilo ou 3-hidroxipropilo; alcoxilo inferior; alcoxi C_{1-6} -alquilo C_{1-6} , tais como 2-metoxietilo, 2-etoxietilo ou 3-metoxipropilo; amino; alquilamino; dialquilamino; ciano; nitro; acilo; carboxilo; alcoxicarbonilo inferior; halogéneo; mercapto; alquiltio C_{1-6} , tal como metiltio, etiltio, propiltio ou butiltio; alquiltio C_{1-6} substituído, tais como metoxietiltio, metiltioetiltio, hidroxietiltio ou cloroetiltio; arilo; arilo monocíclico ou cíclico fundido C_{6-10} substituído, tal como 4-hidroxifenilo, 4-metoxifenilo, 4-fluorofenilo, 4-clorofenilo ou 3,4-diclorofenilo; heterocíclico insaturado de 5-6 membros, tais como furilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, tienilo, piridilo ou pirimidinilo; e heterocíclico bicíclico insaturado,

tais como indolilo, isoindolilo, quinolilo, benzotiazolilo, cromanilo, benzofuranilo ou ftalimino. Além disso, o anel heterocíclico como aqui definido pode estar opcionalmente substituído com um ou mais substituintes, em que os substituintes são iguais ou diferentes, e incluem alquilo C₁₋₆; hidroxi-alquilenos C₁₋₆; alcoxi C₁₋₆-alquilenos C₁₋₆; hidroxilo; alcóxido C₁₋₆; e ciano.

Finalmente, será entendido pelos especialistas na técnica que as imidazoquinolin(aminas) como definidas acima no contexto da presente invenção podem ter também um centro quiral e podem ser isoladas nas formas opticamente activa e racémica. Alguns compostos podem exibir polimorfismo. É para ser entendido que a presente invenção abrange qualquer forma racémica, opticamente activo, polimórfica ou estereoisomérica, ou as suas misturas, de imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados, como definidos acima, os quais possuem as propriedades úteis aqui descritas, sendo bem conhecido na técnica como preparar formas opticamente activas (por exemplo, por resolução da forma racémica por técnicas de recristalização, por síntese a partir de materiais de partida opticamente activos, por síntese quiral ou por separação cromatográfica utilizando uma fase estacionária quiral) e como determinar a actividade agonista de nicotina utilizando os ensaios padrão aqui descritos, ou utilizando outros ensaios semelhante que são bem conhecidos na técnica.

De acordo com uma forma de realização a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção compreende tipicamente uma imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado como aqui definido, de um modo preferido, imiquimod ou um seu derivado, numa quantidade de cerca de 0,005% (p/v) a cerca de 5%

(p/v), de um modo preferido, numa quantidade de cerca de 0,01% (p/v) a cerca de 5% (p/v), de um modo mais preferido, numa quantidade de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 4% (p/v), de um modo ainda mais preferido, numa quantidade de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 3% (p/v), ainda mais preferido, numa quantidade de cerca de 0,2% (p/v) a cerca de 2% (p/v) e de um modo muito preferido, numa quantidade de cerca de 0,2% (p/v) a cerca de 1% (p/v) ou até mesmo numa quantidade de cerca de 0,5% (p/v) a cerca de 1% (p/v), em que as quantidades como definidas em% (p/v) podem ser determinadas com base no peso de imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado como aqui definido, de um modo preferido, imiquimod ou um seu derivado, em relação ao volume total da composição farmacêutica da invenção, quando e. g., proporcionada como uma formulação líquida ou semilíquida. Alternativamente, as quantidades acima podem ser definidas em% (p/p), em que a quantidade como definida em% (p/p) pode ser determinada com base no peso de imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado como definido acima, de um modo preferido, imiquimod ou um seu derivado, em relação ao peso total da composição farmacêutica da invenção.

De acordo com uma forma de realização particular preferida a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção compreende tipicamente uma imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido, de um modo preferido, imiquimod ou um seu derivado, numa quantidade de cerca de 0,005% (p/v) a cerca de 1, 2, 3, 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,01% (p/v) a cerca de 1, 2, 3, 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 1, 2, 3, 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,2% (p/v) a cerca de 1, 2, 3, 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,3% (p/v) a cerca de 1, 2, 3, 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,4% (p/v) a cerca

[illegible]

cerca de 3,3% (p/v) a cerca de 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,4% (p/v) a cerca de 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,5% (p/v) a cerca de 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,6% (p/v) a cerca de 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,7% (p/v) a cerca de 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,8% (p/v) a cerca de 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,9% (p/v) a cerca de 4 ou 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,0% (p/v) a cerca de 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,1% (p/v) a cerca de 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,2% (p/v) a cerca de 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,3% (p/v) a cerca de 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,4% (p/v) a cerca de 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,5% (p/v) a cerca de 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,6% (p/v) a cerca de 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,7% (p/v) a cerca de 5% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,8% (p/v) a cerca de 5% (p/v), ou numa quantidade de cerca de 4,9% (p/v) a cerca de 5% (p/v). Os valores acima podem ser também determinados em% (p/p). Ambos os termos "% (p/v)" e "% (p/p)" são de um modo preferido, como definidos acima.

De acordo com outra forma de realização preferida particular a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção compreende tipicamente uma imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido, de um modo preferido, imiquimod ou um seu derivado, numa quantidade de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 1% (p/v).

De acordo com uma outra forma de realização preferida particular a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção compreende tipicamente uma imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido, de um modo preferido, imiquimod ou um seu derivado, numa quantidade de cerca de 0,005%

(p/v) a cerca de 0,5% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,01%
(p/v) a cerca de 0,5% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,1%
(p/v) a cerca de 0,6% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,2%
(p/v) a cerca de 0,7% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,3%
(p/v) a cerca de 0,8% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,4%
(p/v) a cerca de 0,9% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,5%
(p/v) a cerca de 1,0% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,6%
(p/v) a cerca de 1,1% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,7%
(p/v) a cerca de 1,2% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,8%
(p/v) a cerca de 1,3% (p/v), numa quantidade de cerca de 0,9%
(p/v) a cerca de 1,4% (p/v), numa quantidade de cerca de 1,1%
(p/v) a cerca de 1,5% (p/v), numa quantidade de cerca de 1,2%
(p/v) a cerca de 1,6% (p/v), numa quantidade de cerca de 1,3%
(p/v) a cerca de 1,7% (p/v), numa quantidade de cerca de 1,4%
(p/v) a cerca de 1,8% (p/v), numa quantidade de cerca de 1,5%
(p/v) a cerca de 1,9% (p/v), numa quantidade de cerca de 1,6%
(p/v) a cerca de 2,0% (p/v), numa quantidade de cerca de 1,7%
(p/v) a cerca de 2,1% (p/v), numa quantidade de cerca de 1,8%
(p/v) a cerca de 2,2% (p/v), numa quantidade de cerca de 1,9%
(p/v) a cerca de 2,3% (p/v), numa quantidade de cerca de 2,0%
(p/v) a cerca de 2,5% (p/v), numa quantidade de cerca de 2,1%
(p/v) a cerca de 2,6% (p/v), numa quantidade de cerca de 2,2%
(p/v) a cerca de 2,7% (p/v), numa quantidade de cerca de 2,3%
(p/v) a cerca de 2,8% (p/v), numa quantidade de cerca de 2,4%
(p/v) a cerca de 2,9% (p/v), numa quantidade de cerca de 2,5%
(p/v) a cerca de 3,0% (p/v), numa quantidade de cerca de 2,6%
(p/v) a cerca de 3,1% (p/v), numa quantidade de cerca de 2,7%
(p/v) a cerca de 3,2% (p/v), numa quantidade de cerca de 2,8%
(p/v) a cerca de 3,3% (p/v), numa quantidade de cerca de 2,9%
(p/v) a cerca de 3,4% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,0%
(p/v) a cerca de 3,5% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,1%
(p/v) a cerca de 3,6% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,2%

(p/v) a cerca de 3,7% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,3%
(p/v) a cerca de 3,8% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,4%
(p/v) a cerca de 3,9% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,5%
(p/v) a cerca de 4,0% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,6%
(p/v) a cerca de 4,1% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,7%
(p/v) a cerca de 4,2% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,8%
(p/v) a cerca de 4,3% (p/v), numa quantidade de cerca de 3,9%
(p/v) a cerca de 4,4% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,0%
(p/v) a cerca de 4,5% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,1%
(p/v) a cerca de 4,6% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,2%
(p/v) a cerca de 4,7% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,3%
(p/v) a cerca de 4,8% (p/v), numa quantidade de cerca de 4,4%
(p/v) a cerca de 4,9% (p/v) ou numa quantidade de cerca de 4,5%
(p/v) a cerca de 5,0% (p/v). Os valores acima podem ser também determinados em% (p/p). Ambos os termos "%(p/v)" e "%(p/p)" são, de um modo preferido, como definidos acima.

No entanto, para a preparação da composição farmacêutica da invenção, e. g., quando se prepara uma solução(-mãe) durante a preparação da composição farmacêutica da invenção, a imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido, pode ser dissolvido numa tal solução(-mãe) aquosa compreendendo ácido láctico como definido acima tipicamente numa concentração mais elevada do que a indicada acima para a composição farmacêutica da invenção final. Para esse efeito, a solução(-mãe) pode compreender uma quantidade de cerca de 0,005% (p/v) ou 0,01% (p/v) a cerca de 30% (p/v), de um modo preferido, uma quantidade de cerca de 1% (p/v) a cerca de 25% (p/v), de um modo mais preferido, uma quantidade de cerca de 5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), de um modo ainda mais preferido, uma quantidade de cerca de 10% (p/v) a cerca de 25% (p/v) e de um modo muito preferido, uma quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 20 ou

25% (p/v) de imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido. Os valores acima podem ser entendidos alternativamente como% (p/p). Estas percentagens "% (p/v)" e "%(p/p)" são de um modo preferido, como definidas acima.

De acordo com outra forma de realização, a composição farmacêutica da invenção pode compreender também aditivos ou outros componentes. Vantajosamente, tais aditivos ou outros componentes melhoram a solubilidade e/ou penetração na membrana da imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido, da composição farmacêutica da invenção. Alternativamente ou adicionalmente, tais aditivos ou outros componentes permitem proporcionar uma formulação mais adequada para uma doença específica a ser tratada, conferem uma melhor tolerância à composição farmacêutica da invenção, etc.

De acordo com uma forma de realização particular, a composição farmacêutica da invenção pode compreender ciclodextrinas, as quais são também designadas cicloamiloses. Como surpreendentemente determinado pela requerente da presente invenção, as ciclodextrinas podem ser utilizadas para melhorar a solubilidade e, vantajosamente, a penetração na membrana da imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido, da composição farmacêutica da invenção, ainda que a imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado possa não ser suficientemente dissolvido apenas pelas ciclodextrinas. Neste contexto, a solubilidade da imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido, não é apenas melhorada na composição farmacêutica da invenção final utilizando ciclodextrinas mas também numa solução(-mãe) intermediária formada pela imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido, e um ácido orgânico como definido acima, ácido

lático. Particularmente, foi uma observação inesperada face ao conhecimento da técnica anterior que a ciclodextrina em combinação com o ácido láctico conduz a um incremento pequeno, mas significativo da solubilidade da imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, particularmente de imiquimod, de pelo menos 10%, de um modo mais preferido, de pelo menos 15% ou pelo menos cerca de 18% em comparação com a solubilidade desse agente terapeuticamente activo em combinação com ácido láctico sozinho. Consequentemente, as ciclodextrinas podem ser utilizadas em qualquer fase da preparação da composição farmacêutica para melhorar a solubilidade da imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido. No contexto da presente invenção, as ciclodextrinas são de um modo preferido, entendidas como membros de uma família de oligossacáridos cíclicos, constituídos por 5 ou mais porções α -D-glucopiranosídeo ligadas entre as posições 1 e 4, como conhecido para a amilose, um fragmento de amido. No contexto da presente invenção, as ciclodextrinas compreendem particularmente α -ciclodextrinas, as quais formam moléculas cíclicas com seis membros de açúcar, β -ciclodextrinas, as quais formam moléculas cíclicas com sete açúcares, γ -ciclodextrinas, as quais formam moléculas cíclicas com oito açúcares, δ -ciclodextrinas e ϵ -ciclodextrinas. De um modo particularmente preferido, a composição farmacêutica da invenção compreende α -ciclodextrinas, β -ciclodextrinas e/ou γ -ciclodextrinas, de um modo ainda mais preferido, β -ciclodextrinas, tal como hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD).

Surpreendentemente, a incorporação de HP β CD na formulação farmacêutica da invenção melhorou a estabilidade física, originando uma solução homogénea transparente.

De acordo com um forma de realização particularmente preferida, a composição farmacêutica da invenção como definida acima pode compreender ciclodextrinas como definidas acima numa quantidade de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 30% (p/v), tipicamente numa quantidade de cerca de 1% (p/v) a cerca de 20% (p/v), de um modo preferido, numa quantidade de cerca de 2% (p/v) a cerca de 20% (p/v), de um modo mais preferido, numa quantidade de cerca de 5% (p/v) a cerca de 20% (p/v), de um modo ainda mais preferido, numa quantidade de cerca de 5% (p/v) a cerca de 15% (p/v), e de um modo muito preferido, numa quantidade de cerca de 10% (p/v) a cerca de 15% (p/v) ou numa quantidade de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 4% (p/v), 0,1 a 2%, de um modo mais preferido, numa quantidade de 0,5 a 2% ou, alternativamente, numa quantidade de cerca de 2% (p/v) a cerca de 6% (p/v), numa quantidade de cerca de 4% (p/v) a cerca de 8% (p/v), numa quantidade de cerca de 6% (p/v) a cerca de 10% (p/v), numa quantidade de cerca de 8% (p/v) a cerca de 12% (p/v), numa quantidade de cerca de 10% (p/v) a cerca de 14% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 16% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 16% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 18% (p/v) a cerca de 22% (p/v), numa quantidade de cerca de 20% (p/v) a cerca de 24% (p/v), numa quantidade de cerca de 22% (p/v) a cerca de 26% (p/v), numa quantidade de cerca de 24% (p/v) a cerca de 28% (p/v) ou numa quantidade de cerca de 26% (p/v) a cerca de 30% (p/v), em que as quantidades como definidas em% (p/v) podem ser entendidas como sendo com base no peso da ciclodextrina em relação ao volume total da composição farmacêutica da invenção ou uma solução-mãe intermediária, quando e. g., proporcionada como uma formulação líquida ou semilíquida. Alternativamente, as quantidades acima podem ser definidas em% (p/p), em que a

quantidade como definido em% (p/p) pode ser determinada com base no peso da ciclodextrina em relação ao peso total da composição farmacêutica da invenção ou com base numa solução-mãe intermediária.

De acordo com uma outra forma de realização particularmente preferida, a composição farmacêutica da invenção como definida acima pode compreender ciclodextrinas como definidas acima numa quantidade de cerca de 2% (p/v) a cerca de 6% (p/v), e. g. de cerca de 2,5% (p/v) a cerca de 6% (p/v), de cerca de 3% (p/v) a cerca de 6% (p/v), de cerca de 3,5% (p/v) a cerca de 6% (p/v), de cerca de 4% (p/v) a cerca de 6% (p/v), de cerca de 4,5% (p/v) a cerca de 6% (p/v), ou de cerca de 2,5% (p/v) a cerca de 5,5% (p/v), cerca de 3% (p/v) a cerca de 5,5% (p/v), de cerca de 3,5% (p/v) a cerca de 5,5% (p/v), de cerca de 4% (p/v) a cerca de 5,5% (p/v), de cerca de 4,5% (p/v) a cerca de 5,5% (p/v), ou de cerca de 5% (p/v).

De acordo com outra forma de realização particularmente preferida, particularmente para certas formas de administração e aplicações, a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção compreende ainda pelo menos um agente termosensível. No contexto da presente invenção, a expressão "agente termosensível" refere-se tipicamente a um composto, de um modo preferido, um polímero, que é capaz de mudar o seu estado de agregação ou a sua viscosidade num ponto de transição definido (transição cooperativa) de um estado líquido ou semilíquido para um estado sólido ou semi-sólido, de um modo preferido, para um estado sólido. De um modo mais preferido, o termo "agente termosensível" refere-se tipicamente a um composto, de um modo preferido, um polímero (orgânico), que é capaz de mudar o seu estado de agregação de um estado líquido ou semilíquido para um

estado sólido ou semi-sólido (e. g. de um estado líquido para um estado tipo gel ou para um estado sólido) a um ponto de transição específico (também chamado "temperatura de solução crítica inferior" (LCST) ou "temperatura de transição de gel"), em que o ponto de transição específico é, de um modo preferido, definido por uma temperatura de transição específica numa gama de cerca de 15 °C a cerca de 35 °C, de um modo mais preferido, numa gama de cerca de 15 °C a cerca de 30 °C, de um modo ainda mais preferido, numa gama de cerca de 15 ou 20 °C a cerca de 30 °C, de um modo muito preferido, numa gama de cerca de 15 ou 20 °C a cerca de 25 °C. A "temperatura de solução crítica inferior" de acordo com a presente invenção é medida à pressão ambiente e depende da distribuição de massa molar do agente termossensível. De um modo preferido, um tal agente termossensível como definido acima permite a gelificação *in situ* do agente termossensível e qualquer composto ou composição formulado com o mesmo, e. g., a composição farmacêutica da invenção à temperatura corporal, enquanto que a composição farmacêutica exibirá tipicamente propriedades (semi)líquidas. Neste contexto, uma gelificação *in situ* do agente termossensível e qualquer composto ou composição formulado com o mesmo ocorre, de forma típica, directamente durante ou directamente após a administração da composição farmacêutica da invenção ao sítio de aflição do doente a ser tratado, i. e. não antes da administração da composição farmacêutica da invenção. Uma tal gelificação *in situ* é particularmente vantajosa para aplicações específicas, as quais se destinam a libertar a imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado da composição farmacêutica da invenção como aqui definida ao longo de um intervalo de tempo prolongado. Essas aplicações são geralmente dirigidas à colocação da formulação numa cavidade corporal, e. g. de um tecido ou órgão, tal como a bexiga e podem, por

consequente, ser particularmente adequadas, e. g., para administração vesical na terapia de doenças da bexiga.

Uma vantagem particular de uma composição farmacêutica da presente invenção compreendendo agentes termossensíveis é a facilidade da sua administração devido à selecção de um ponto de transição numa gama de temperatura como definida acima. Mais especificamente, a selecção de um ponto de transição numa gama de temperatura como definida acima permite não só preparar ou conservar a composição farmacêutica da invenção num estado agregado líquido ou semilíquido. Ela permite também administrar a composição farmacêutica da invenção (de um modo preferido, líquida) e. g., por injeção, uma vez que a composição farmacêutica da invenção solidifica directamente ou sofre gelificação após administração devido à maior temperatura do tecido ou órgão circundante, a qual é, de um modo preferido, superior à temperatura do ponto de transição. Consequentemente, a gelificação é induzida no tecido ou órgão. A administração desse modo pode ser realizada utilizando métodos não invasivos (sem cirurgia), tal como uma agulha de injeção possuindo um cânula de um diâmetro adequado, um tubo de injeção, métodos endoscópicos, etc. Além disso, essa gelificação resulta em propriedades bioadesivas melhoradas da composição farmacêutica da invenção da presente invenção levando a uma exposição prolongada da imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado da composição farmacêutica da invenção às células que expressam TLR7 e menos penetração sistémica do fármaco. Como mencionado acima, a exposição de imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado às células que expressam TLR7 induz uma resposta imunológica que exerce o efeito terapêutico desejado.

Além disso, as composições farmacêuticas da presente invenção compreendendo agentes termossensíveis evitam vantajosamente ou, pelo menos, reduzem significativamente os efeitos secundários sistêmicos da imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado devido à administração local no sítio de aflição, maior viscosidade *in vivo* da composição farmacêutica da invenção, difusão reduzido do agente biologicamente activo para os tecidos circundantes e, além disso, em alguns casos também devido às melhores propriedades bioadesivas.

Finalmente, as composições farmacêuticas da presente invenção compreendendo agentes termossensíveis permitem vantajosamente a chamada "libertação prolongada" (ou por vezes chamada "libertação de longa duração") da imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado ali contido. Particularmente, a gelificação da composição farmacêutica da invenção resulta numa libertação sustida do fármaco de imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado numa cinética de ordem zero que melhora a duração do efeito terapêutico. Esse efeito terapêutico prolongado da imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado contido na composição farmacêutica da invenção também evita a administração repetida da composição farmacêutica da invenção, particularmente em intervalos de tempo curtos, a qual não pode ser tipicamente evitada quando se utilizam composições farmacêuticas que não apresentam a libertação sustida do fármaco. O efeito de depósito de uma composição farmacêutica da invenção dura tipicamente pelo menos 24h, de um modo mais preferido, 48h, de um modo mais preferido, pelo menos 7 dias, libertando tipicamente o agente activo em quantidades aproximadamente constantes ao longo do tempo (e. g., quantidades de libertação comparáveis em 24 h, e. g., no dia 2 e dia 8 após administração).

De acordo com uma forma de realização específica preferida, a composição farmacêutica da invenção como definida acima contém um agente termossensível como aqui definido numa quantidade de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 40% (p/v), de um modo preferido, entre 0,1 e 5% (de um modo mais preferido, 0,1 e 2%) ou, de forma alternativa, tipicamente numa quantidade de cerca de 2% (p/v) a cerca de 30% (p/v), de um modo preferido, numa quantidade de cerca de 5% (p/v) a cerca de 30% (p/v), de um modo mais preferido, numa quantidade de cerca de 10% (p/v) a cerca de 30% (p/v), e de um modo muito preferido, numa quantidade de cerca de 10% (p/v) a cerca de 25% (p/v), e. g., numa quantidade de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 10% (p/v), numa quantidade de cerca de 5% (p/v) a cerca de 15% (p/v), numa quantidade de cerca de 10% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 11% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 16% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 10% (p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 10% (p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 10% (p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 11% (p/v) a cerca de 16% (p/v), numa quantidade de cerca de 11% (p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 11% (p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 11% (p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 16% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 16% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%

(p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%
(p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%
(p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%
(p/v) a cerca de 16% (p/v), numa quantidade de cerca de 14%
(p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 14%
(p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 14%
(p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 14%
(p/v) a cerca de 16% (p/v), numa quantidade de cerca de 15%
(p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 15%
(p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 15%
(p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 15%
(p/v) a cerca de 16% (p/v), numa quantidade de cerca de 15%
(p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 20%
(p/v) a cerca de 30% (p/v), numa quantidade de cerca de 25%
(p/v) a cerca de 35% (p/v), ou numa quantidade de cerca de 30%
(p/v) a cerca de 40% (p/v), em que as quantidades como definidas em% (p/v) podem ser entendidas como sendo dadas como base no peso do agente termossensível como aqui definido em relação ao volume total da composição farmacêutica da invenção ou uma solução-mãe intermediária, quando, e. g., proporcionada como uma formulação líquida ou semilíquida. Alternativamente, as quantidades acima podem ser definidas em% (p/p), em que a quantidade como definida em% (p/p) pode ser entendida como sendo com base no peso do agente termossensível como aqui definido em relação ao peso total da composição farmacêutica da invenção.

De acordo com outra forma de realização preferida da presente invenção, a composição farmacêutica compreende uma imidazoquinolin(amina), pelo menos, um ácido orgânico seleccionado de ácido láctico e pelo menos um agente termossensível, em que o, pelo menos, um agente termossensível é, de um modo preferido, seleccionado de quitosano ou seus

derivados, ou de um copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (também designado PEO-PPO-PEO ou poloxâmero).

De acordo com uma forma de realização preferida, a composição farmacêutica da invenção como definida acima contém como um agente termossensível um quitosano ou um seu derivado. No contexto da presente invenção, um tal quitosano é, de um modo preferido, entendido como um polissacárido linear constituído por D-glucosamina (porção desacetilada) e N-acetil-D-glucosamina (porção acetilada) ligadas em β -(1-4), distribuídas aleatoriamente. Tipicamente, o quitosano é produzido comercialmente por desacetilação de quitina, a qual é o elemento estrutural no exosqueleto de crustáceos tais como caranguejos, camarões, etc. O grau de desacetilação (%DA) é tipicamente determinado por espectroscopia de RMN, em que a %DA nos quitosanos comerciais está tipicamente na gama de 60-100%. Além disso, no contexto da presente invenção, os quitosanos incluem os seus derivados tal como trimetilquitosano, em que o grupo amino de quitosano foi trimetilado ou derivados oligoméricos (3-6 kDa) de quitosanos.

De acordo com uma outra forma de realização mais preferida, a composição farmacêutica da invenção como definida acima contém como um agente termossensível um poloxâmero. Os poloxâmeros, solubilizados em concentrações relativamente elevadas (> 17,5%) em água, são capazes de produzir sistemas que são líquidos a baixa temperatura (abaixo da temperatura ambiente) e que formam estruturas semi-sólidas ou sólidas tipo geleia, ou geles a temperaturas elevadas. Os poloxâmeros estão comercialmente disponíveis sob a marca registada Pluronic e Lutrol (BASF AG, Ludwigshafen, Alemanha). Os poloxâmeros estão presentes em

muitos produtos farmacêuticos comercializados como solubilizantes, tensioactivos, agentes de viscosidade e gelificantes. Neste contexto, de um modo preferido, a composição farmacêutica da invenção não compreende quaisquer outros componentes que apresentem propriedades tensioactivas além desses componentes termossensíveis, e. g., poloxâmeros, os quais apresentam adicionalmente propriedades tensioactivas.

As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção compreendendo um agente termossensível são particularmente vantajosas. Por exemplo, a aplicação intravesical de composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção compreendendo um agente termossensível, tal como por exemplo, poloxâmero, evita a absorção sistémica e, além disso, proporciona um aumento do contacto local da imidazoquinolina(amina) com o urotélio. Assim, a adição de um agente termossensível reduz a absorção sistémica da imidazoquinolina(amina) a partir do urotélio da bexiga com infiltração local sustida de células imunitárias.

Os poloxâmeros no contexto da presente invenção são tipicamente para ser entendidos como um copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno), também abreviado como "PEO-PPO-PEO". Consequentemente, tais poloxâmeros são copolímeros de tribloco não iónicos constituídos por um cadeia hidrófoba central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por duas cadeias hidrófilas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)). Em geral, o peso molecular de tais poloxâmeros não está especificamente definido e pode variar de um modo adequado para cada finalidade específica. Uma vez que os comprimentos dos blocos poliméricos podem ser feitos à medida, um sem-número de poloxâmeros pode ser

proporcionado possuindo propriedades ligeiramente diferentes. Para o termo genérico "poloxâmero", estes copolímeros são geralmente denominados com a letra "P" (para poloxâmero) seguida de três dígitos, os primeiros dois dígitos $\times 100$ dão a massa molecular aproximada do núcleo de polioxipropileno e o último dígito $\times 10$ dá a o teor de polioxietileno em percentagem (e. g., P407 = Poloxâmero com um polioxipropileno de massa molecular de 4000 g/mol e um teor de 70% em polioxietileno). Para o nome comercial Pluronic/Lutrol, a codificação destes copolímeros começa com uma letra para definir a sua forma física à temperatura ambiente (L = líquido, P = pasta, F = flocos (sólido)) seguida de dois ou três dígitos. O primeiro dígito (dois dígitos num número de três dígitos) da designação numérica, multiplicado por 300, indica o peso molecular aproximado do hidrófobo; e os últimos dígitos $\times 10$ dá o teor de polioxietileno em percentagem (e. g., L61 = Pluronic com um polioxipropileno com massa molecular de 1800 g/mol e um teor de 10% de polioxietileno). No exemplo dado, poloxâmero 181 (P181) = Pluronic L61.

Os poloxâmeros adequados para a composição farmacêutica da invenção como um agente termossensível compreendem, de um modo preferido, qualquer copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) ou mistura de tais copolímeros adequados para a finalidade da invenção, i. e. qualquer polímero PEO-PPO-PEO ou mistura de tais copolímeros exibindo propriedades termossensíveis como definidas acima. Tais polímeros PEO-PPO-PEO incluem também polímeros PEO-PPO-PEO comercialmente disponíveis e as suas misturas, e. g., Pluronic F 108 Cast Solid Surfacta; Pluronic F 108 Pastille; Pluronic F 108 Prill; Pluronic F 108NF Prill (Poloxâmero 338); Pluronic F 127;

Pluronic F 127 Prill; Pluronic F 127 NF; Pluronic F 127 NF 500 BHT Prill; Pluronic F 127 NF Prill (Poloxâmero 407); Pluronic F 38; Pluronic F 38 Pastille; Pluronic F 68; Pluronic F 68 Pastille; Pluronic F 68 LF Pastille; Pluronic F 68 NF Prill (Poloxâmero 188); Pluronic F 68 Prill; Pluronic F 77; Pluronic F 77 Micropastille; Pluronic F 87; Pluronic F 87 NF Prill (Poloxâmero 237); Pluronic F 87 Prill; Pluronic F 88 Pastille; Pluronic F 88 Prill; Pluronic F 98; Pluronic F 98 Prill; Pluronic L 10; Pluronic L 101; Pluronic L 121; Pluronic L 31; Pluronic L 35; Pluronic L 43; Pluronic L 44; Pluronic L 44 NF (Poloxâmero 124); Pluronic L 61; Pluronic L 62; Pluronic L 62 LF; Pluronic L 62D; Pluronic L 64; Pluronic L 81; Pluronic L 92; Pluronic L44 NF INH Surfactant (Poloxâmero 124); Pluronic N 3; Pluronic P 103; Pluronic P 104; Pluronic P 105; Pluronic P 123 Surfactant; Pluronic P 65; Pluronic P 84; Pluronic P 85; e Poloxâmero 403. Além disso, tais polímeros PEO-PPO-PEO incluem misturas constituídas por quaisquer dois ou mais (3, 4, 5, 6, etc.) destes polímeros PEO-PPO-PEO.

De um modo mais preferido, os poloxâmeros adequados para a composição farmacêutica da invenção como um agente termossensível incluem poloxâmeros ou as suas misturas, os poloxâmeros seleccionados de Poloxâmero 124, Poloxâmero 188, Poloxâmero 237, Poloxâmero 338, Poloxâmero 403 e Poloxâmero 407. Assim, utilizando as etiquetas de codificação de poloxâmeros da BASF, os poloxâmeros adequados são seleccionados de Pluronic/Lutrol F 44 (poloxâmero 124), Pluronic/Lutrol F 68 (poloxâmero 188), Pluronic/Lutrol F 87 (poloxâmero 237), Pluronic/Lutrol F 108 (poloxâmero 338), Pluronic/Lutrol F 123 (poloxâmero 403), Pluronic/Lutrol F 127 (poloxâmero 407).

De um modo ainda mais preferido, os poloxâmeros adequados para a composição farmacêutica da invenção como um agente termossensível incluem poloxâmeros ou as suas misturas, os poloxâmeros seleccionados de Poloxâmero 188, Poloxâmero 403 e Poloxâmero 407.

Entre os diferentes polímeros PEO-PPO-PEO adequados para a composição farmacêutica da invenção como um agente termossensível, o Poloxâmero 407 é, de um modo muito preferido, seleccionado e representa o polímero de primeira escolha para a produção de geles termossensíveis no contexto da presente invenção. O Poloxâmero 407 como um agente termossensível pode ser utilizado sozinho ou em mistura com outros poloxâmeros como descritos acima, de um modo preferido, com Poloxâmero 188, para produzir uma mistura de agentes termossensíveis que "gelificam" a uma temperatura seleccionada, de um modo preferido, ligeiramente acima da temperatura ambiente ($> 20^{\circ}\text{C}$), mas abaixo da temperatura corporal ($< 37^{\circ}\text{C}$).

De acordo com um forma de realização particularmente preferida, a composição farmacêutica da invenção compreende como um agente termossensível Poloxâmero 407 numa quantidade como definida em geral acima para os agentes termossensíveis, de um modo mais preferido, numa quantidade de cerca de 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10% (p/v) a cerca de 30% (p/v), de um modo ainda mais preferido, numa quantidade de cerca de 5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), e de um modo muito preferido, numa quantidade de cerca de 10% (p/v) a cerca de 25% (p/v), e. g., numa quantidade de cerca de 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 10,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 11% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de

11,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 12,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 13,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 14,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 15,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 16% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 16,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 17% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 17,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 18% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 18,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 19% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 19,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 20% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 20,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 21% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 21,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 22% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 22,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 23% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 23,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 24% (p/v) a cerca de 25% (p/v), ou numa quantidade de cerca de 24,5% (p/v) a cerca de 25% (p/v), ou mais particularmente numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa quantidade de cerca de 16% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa

quantidade de cerca de 17% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa
 quantidade de cerca de 18% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa
 quantidade de cerca de 19% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa
 quantidade de cerca de 20% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa
 quantidade de cerca de 21% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa
 quantidade de cerca de 22% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa
 quantidade de cerca de 23% (p/v) a cerca de 25% (p/v), numa
 quantidade de cerca de 24% (p/v) a cerca de 25% (p/v) ou mais
 particularmente numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de
 24% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 23%
 (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 22%
 (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 21%
 (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 20%
 (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 19%
 (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 18%
 (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 17%
 (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 16%
 (p/v) ou mais particularmente numa quantidade de cerca de 13%
 (p/v) a cerca de 24% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%
 (p/v) a cerca de 23% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%
 (p/v) a cerca de 22% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%
 (p/v) a cerca de 21% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%
 (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%
 (p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%
 (p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%
 (p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 13%
 (p/v) a cerca de 16% (p/v) ou mais particularmente numa
 quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 24% (p/v), numa
 quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 23% (p/v), numa
 quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 22% (p/v), numa
 quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 21% (p/v), numa
 quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa

quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 16% (p/v) ou mais particularmente numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 24% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 23% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 22% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 21% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 16% (p/v) ou mais particularmente numa quantidade de cerca de 24% (p/v) a cerca de 25% (p/v), em que as quantidades como definidas em% (p/v) podem ser entendidas como sendo com base no peso do agente termossensível como aqui definido em relação ao volume total da composição farmacêutica da invenção ou uma solução-mãe intermediária, quando *e. g.*, proporcionada como uma formulação líquida ou semilíquida. Alternativamente, as quantidades acima podem ser definidas em% (p/p), em que a quantidade como definido em% (p/p) pode ser entendida como sendo com base no peso do agente termossensível como aqui definido em relação ao peso total da composição farmacêutica da invenção.

De acordo com uma outra forma de realização preferida, a composição farmacêutica da invenção pode compreender como um agente termossensível qualquer um dos poloxâmeros como definidos acima, de um modo preferido, qualquer um dos poloxâmeros seleccionados de Poloxâmero 124, Poloxâmero 188, Poloxâmero 237, Poloxâmero 338 e Poloxâmero 403. Tais poloxâmeros estão, de um modo preferido, presentes na composição farmacêutica da invenção

como um agente termossensível em quantidades como descritas acima para os agentes termossensíveis em geral ou, mais especificamente, como descrito acima para o Poloxâmero 407.

De acordo com uma forma de realização particularmente preferida, a composição farmacêutica da invenção também pode compreender como um agente termossensível uma mistura de qualquer um dos agentes termossensíveis como definidos acima. Uma tal mistura de agentes termossensíveis compreende de um modo preferido, uma quantidade total do agente termossensível de uma tal mistura semelhante como descrita em geral acima para os agentes termossensíveis ou mais especificamente como descrito acima para o Poloxâmero 407. Além disso, uma tal mistura de agentes termossensíveis compreende, de um modo preferido, uma proporção dos diferentes poloxâmeros, que conduz a uma mistura de agentes termossensíveis que "gelifica" a uma temperatura desejada, de um modo preferido, a uma gama de temperaturas como definida acima. Neste contexto, a proporção e/ou a quantidade dos diferentes poloxâmeros na mistura pode influenciar a "Temperatura de Solução Crítica Inferior" (LCST) e, desse modo, a temperatura de transição de gel. Por exemplo, foi determinado que a diminuição da percentagem de Poloxâmero 407 numa mistura com Poloxâmero 188 resulta num aumento da LCST. Além disso, a quantidade e/ou proporção dos diferentes poloxâmeros na mistura é, de um modo preferido, seleccionada em relação à solubilidade do fármaco. De um modo preferido, quaisquer dois dos agentes termossensíveis como definidos acima, particularmente quando proporcionados numa quantidade como definida acima, podem estar contidos na composição farmacêutica da invenção como uma mistura numa proporção de cerca de 1:20 a cerca de 20:1, de um modo preferido, numa proporção de cerca de 1:20, 2:20, 3:30, 4:20, 5:20, 6:20, 7:20, 8:20, 9:20, 10:20, 11:20, 12:20, 13:20, 14:20,

15:20, 16:20, 17:20, 18:20, 19:20, 20:20 (= 1:1), ou numa proporção de cerca de 20:20, 19:20, 18:20, 17:20, 16:20, 15:20, 14:20, 13:20, 12:20, 11:20, 10:20, 9:20, 8:20, 7:20, 6:20, 5:20, 4:20, 3:20, 2:20 ou cerca de 1:20, ou numa proporção de cerca de 1:20, 1:19, 2:18, 3:17, 4:16, 5:15, 6:14, 7:13, 8:12, 9:11, 10:10 (1:1), 11:9, 12:8, 13:7, 14:6, 15:5, 16:4, 17:3, 18:2, 19:1 ou 20:1, ou numa gama formada por quaisquer dois dos valores de proporção como definidos acima. De um modo ainda mais preferido, quaisquer dois dos agentes termossensíveis como definidos acima, particularmente quando proporcionados numa quantidade como definida acima, podem estar contidos na composição farmacêutica da invenção como uma mistura numa gama de cerca de 1:10 a cerca de 10:1, e. g., numa proporção de cerca de 1:10, 2:10, 3:10, 4:10, 5:10, 6:10, 7:10, 8:10, 9:10 ou 10:10 (i. e. 1:1), ou numa proporção de cerca de 10:9, 10:8, 10:7, 10:6, 10:5, 10:4, 10:3, 10:2 ou 10:1, ou numa gama formada por quaisquer dois dos valores de proporção como definidos acima.

De um modo ainda mais preferido, a composição farmacêutica da invenção pode compreender como um agente termossensível uma mistura de Poloxâmero 407 e qualquer um dos poloxâmeros descritos acima, de um modo ainda mais preferido, seleccionados de Poloxâmero 124, Poloxâmero 188, Poloxâmero 237, Poloxâmero 338 e Poloxâmero 403. Do mesmo modo, uma tal mistura de agentes termossensíveis compreende, de um modo preferido, uma quantidade total dos agentes termossensíveis da mistura semelhante à descrita em geral acima para os agentes termossensíveis ou, mais especificamente, como descrito acima para o Poloxâmero 407.

De acordo com uma forma de realização particularmente preferida, a composição farmacêutica da invenção pode

compreender como um agente termossensível uma mistura de Poloxâmero 407 e Poloxâmero 188. De um modo preferido, uma tal mistura de Poloxâmero 407 e Poloxâmero 188 está contida na composição farmacêutica da invenção numa quantidade total como descrita em geral acima para os agentes termossensíveis ou, mais especificamente, como descrito acima para o Poloxâmero 407. De um modo preferido, uma tal mistura de Poloxâmero 407 e Poloxâmero 188 ocorre também na composição farmacêutica da invenção numa proporção como descrita em geral acima para as misturas de poloxâmeros utilizadas como um agente termossensível na composição farmacêutica da invenção. De um modo ainda mais preferido, uma tal proporção é seleccionada de uma proporção de Poloxâmero 407:Poloxâmero 188 de cerca de 1:20, 1:19, 2:18:, 3:17, 4:16, 5:15, 6:14, 7:13, 8:12, 9:11, 10:10 (1:1), 11:9, 12:8, 13:7, 14:6, 15:5, 16:4, 17:3, 18:2, 19:1 ou 20:1, ou uma proporção formada por quaisquer dois dos valores como definidos acima. De um modo muito preferido, uma tal proporção é seleccionada de uma proporção de Poloxâmero 407:Poloxâmero 188 de cerca de 7:3, 7,5:2,5, 8:2, 8,5:1,5, 9:1 ou 9,5:0,5, ou uma proporção formada por quaisquer dois destes valores. Consequentemente, o teor absoluto de Poloxâmero 188 e de Poloxâmero 407 na composição farmacêutica da invenção pode ser determinado com base na quantidade total e na proporção específica de ambos os poloxâmeros na composição farmacêutica da invenção.

De acordo com uma forma de realização específica, a composição farmacêutica da invenção pode compreender como um agente termossensível Poloxâmero 407 numa quantidade (total) de cerca de 17,5% (p/v)/(p/p) a cerca de 22,5% (p/v)/(p/p), de um modo mais preferido, num quantidade total de cerca de 17,5% (p/v)/(p/p), de cerca de 18,0% (p/v)/(p/p), de cerca de 18,5%

(p/v)/(p/p), de cerca de 19,0% (p/v)/(p/p), de cerca de 19,5%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 20,0% (p/v)/(p/p), de cerca de 20,5%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 21,0% (p/v)/(p/p), de cerca de 21,5%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 22,0% (p/v)/(p/p), ou de cerca de 22,5%
 (p/v)/(p/p) ou numa quantidade (total) de cerca de 10%
 (p/v)/(p/p) a cerca de 22,5% (p/v)/(p/p), de um modo mais
 preferido, numa quantidade total de cerca de 11% (p/v)/(p/p) a
 cerca de 22,5% (p/v)/(p/p), de cerca de 12,0% (p/v)/(p/p) a
 cerca de 22,5% (p/v)/(p/p), de cerca de 13% (p/v)/(p/p) a cerca
 de 22,5% (p/v)/(p/p), de cerca de 14,0% (p/v)/(p/p) a cerca de
 22,5% (p/v)/(p/p), de cerca de 15,0% (p/v)/(p/p) a cerca de
 22,5% (p/v)/(p/p), de cerca de 15,5% (p/v)/(p/p) a cerca de
 22,5% (p/v)/(p/p), de cerca de 16,0% (p/v)/(p/p) a cerca de
 22,5% (p/v)/(p/p), ou de cerca de 11% (p/v)/(p/p) a cerca de
 20,0% (p/v)/(p/p), de cerca de 12,0% (p/v)/(p/p) a cerca de
 20,0% (p/v)/(p/p), de cerca de 13% (p/v)/(p/p) a cerca de 20,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 14,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 20,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 15,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 20,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 15,5% (p/v)/(p/p) a cerca de 20,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 16,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 20,0%
 (p/v)/(p/p), ou de cerca de 11% (p/v)/(p/p) a cerca de 19,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 12,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 19,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 13% (p/v)/(p/p) a cerca de 19,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 14,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 19,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 15,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 19,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 15,5% (p/v)/(p/p) a cerca de 19,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 16,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 19,0%
 (p/v)/(p/p), ou de cerca de 11% (p/v)/(p/p) a cerca de 18,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 12,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 18,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 13% (p/v)/(p/p) a cerca de 18,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 14,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 18,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 15,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 18,0%

(p/v)/(p/p), de cerca de 15,5% (p/v)/(p/p) a cerca de 18,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 16,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 18,0%
 (p/v)/(p/p), ou de cerca de 11% (p/v)/(p/p) a cerca de 17,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 12,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 17,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 13% (p/v)/(p/p) a cerca de 17,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 14,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 17,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 15,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 17,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 15,5% (p/v)/(p/p) a cerca de 17,0%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 16,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 17,0%
 (p/v)/(p/p), ou de cerca de 11% (p/v)/(p/p) a cerca de 16,5%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 12,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 16,5%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 13% (p/v)/(p/p) a cerca de 16,5%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 14,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 16,5%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 15,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 16,5%
 (p/v)/(p/p), de cerca de 15,5% (p/v)/(p/p) a cerca de 16,5%
 (p/v)/(p/p). (O termo (p/v)/(p/p) significa (p/v) ou (p/p)) ou
 qualquer gama formada por quaisquer dois destes valores como
 definidos acima.

De acordo com uma outra forma de realização específica, a
 composição farmacêutica da invenção pode compreender como um
 agente termossensível uma mistura de Poloxâmero 407 e
 Poloxâmero 188 numa quantidade total de cerca de 22,5%
 (p/v)/(p/p) a cerca de 27,5% (p/v)/(p/p), de um modo mais
 preferido, numa quantidade total de cerca de 25% (p/v)/(p/p) e,
 de um modo preferido, numa proporção de Poloxâmero
 407:Poloxâmero 188 de cerca de 15:5, 16:4, 17:3, 18:2, 19:1 ou
 20:1, ou uma proporção formada por quaisquer dois destes
 valores, de um modo mais preferido, numa proporção de cerca de
 9,5:0,5, de cerca de 9:1, de cerca de 8,5:1,5 ou de cerca de
 8:2, ou uma proporção formada por quaisquer dois destes valores.
 Consequentemente, quando a composição farmacêutica da invenção

compreende uma mistura de Poloxâmero 407 e Poloxâmero 188, o Poloxâmero 407 pode estar presente na composição farmacêutica da invenção numa quantidade de cerca de 15,5% (p/v)/(p/p) a cerca de 26,5% (p/v)/(p/p), de um modo preferido, numa quantidade de cerca de 17,5% (p/v)/(p/p) a cerca de 22,5% (p/v)/(p/p), enquanto que o Poloxâmero 188 pode estar presente na composição farmacêutica numa quantidade de cerca de 1,0% (p/v)/(p/p) a cerca de 6,0% (p/v)/(p/p), de um modo preferido, numa quantidade de cerca de 2,5% (p/v)/(p/p) a cerca de 4,5% (p/v)/(p/p). (O termo (p/v)/(p/p) significa (p/v) ou (p/p)).

Além disso, a composição farmacêutica da invenção pode compreender aditivos ou outros componentes, tais como, *e. g.*, ciclodextrina como definida acima. Neste contexto, o teor dos aditivos, particularmente ciclodextrina, pode ter uma influência na chamada "temperatura de solução crítica inferior" (LCST) ou "temperatura de transição de gel", definida acima. Como um exemplo particular, percentagens crescentes de ciclodextrina resultam num aumento da LCST do Poloxâmero 407 ou de uma mistura de Poloxâmero 407 e Poloxâmero 188 como definida acima. Isto pode ser adequadamente aplicado a outros poloxâmeros como definidos acima e a outros agentes termossensíveis como aqui definidos.

Do mesmo modo, a LCST das composições farmacêuticas são influenciadas de modo diferente pelo ácido acético e pelo ácido láctico. Ambos os ácidos aumentam geralmente a LCST das composições. No entanto, enquanto, *e. g.*, o imiquimod não influencia de todo a temperatura de transição de gel de composições farmacêuticas compreendendo apenas ácido acético, a LCST de composições compreendendo ácido láctico é melhorada.

De acordo com uma outra forma de realização, a composição farmacêutica de acordo com a invenção pode compreender ainda um transportador e/ou veículo farmacêuticamente aceitável. No contexto da presente invenção, um transportador farmacêuticamente aceitável inclui tipicamente uma base líquida da composição farmacêutica da invenção, e. g., água apirogênica; a solução isenta de água pode ser combinada em qualquer proporção apropriada com um solvente orgânico farmacêuticamente aceitável, miscível com água, e. g., um álcool (e. g., etanol ou isopropanol); os seguintes podem ser também utilizados: soluções (aquosa) salinas isotônicas ou tamponadas, e. g., soluções tamponadas com fosfato, citrato, etc., uma solução aquosa tamponada, uma solução aquosa tamponada contendo, e. g., um sal de sódio, de um modo preferido, pelo menos 50 mM de um sal de sódio, um sal de cálcio, de um modo preferido, pelo menos 0,01 mM de um sal de cálcio e/ou um sal de potássio, de um modo preferido, pelo menos 3 mM de um sal de potássio. De acordo com uma forma de realização preferida, os sais de sódio, cálcio e/ou potássio podem ocorrer na forma dos seus halogenetos, e. g., cloretos, iodetos ou brometos, na forma dos seus hidróxidos, carbonatos, hidrogenocarbonatos ou sulfatos, etc. Sem se estar limitado a estes, os exemplos de sais de sódio incluem, e. g., NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, exemplos dos sais de potássio opcionais incluem, e. g., KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄, e os exemplos de sais de cálcio incluem, e. g., CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. Além disso, na composição da invenção podem estar contidos aniões orgânicos dos catiões acima mencionados. De acordo com uma forma de realização mais preferida, a composição da invenção adequada para efeitos de injeção como definida acima, pode conter sais seleccionados de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl₂) e opcionalmente cloreto de potássio (KCl), em que podem ser

presentes outros aniões além dos cloretos. O CaCl_2 pode ser também substituído por outro sal como KCl . A composição da invenção pode ser hipertónica, isotónica ou hipotónica relativamente ao meio de referência específico, i. e. a composição da invenção pode ter um teor de sal superior, idêntico ou inferior relativamente ao meio de referência específico, em que de um modo preferido, podem ser utilizadas concentrações dos sais acima mencionados, que não conduzam a danos nas células devido a osmose ou outros efeitos da concentração. Os meios de referência são, e. g., líquidos que ocorrem em métodos "*in vivo*", tais como sangue, linfa, líquidos citosólicos ou outros líquidos corporais ou, e. g., líquidos, que podem ser utilizados como meio de referência em métodos "*in vitro*", tais como tampões ou líquidos comuns. Tais tampões ou líquidos comuns são conhecidos de um especialista.

No entanto podem ser utilizados um ou mais enchimentos sólidos ou líquidos compatíveis ou diluentes ou compostos de encapsulação, bem como para a composição farmacêutica da invenção, que são adequados para administração a um doente a ser tratado. O termo "compatível" como aqui utilizado significa que estes constituintes da composição farmacêutica da invenção sejam capazes de ser misturados com as imidazoquinolin(aminas) ou seus derivados, como definidos de acordo com a presente invenção, de tal modo que não ocorre qualquer interacção que reduza substancialmente a eficácia farmacêutica da composição farmacêutica da invenção em condições de utilização típicas. Os transportadores, enchimentos e diluentes farmacêuticamente aceitáveis têm de ter, evidentemente, pureza suficientemente elevada e toxicidade suficientemente baixa para os tornar adequados para administração numa pessoa a ser tratada. Alguns exemplos de compostos que podem ser utilizados como

transportadores, enchimentos ou seus constituintes farmacêuticamente aceitáveis são açúcares, tais como por exemplo, lactose, glucose e sacarose; amidos, tais como por exemplo, amido de milho ou amido de batata; celulose e seus derivados, tais como por exemplo, carboximetilcelulose sódica, etilcelulose, acetato de celulose; tragacanta em pó; malte; gelatina; sebo; deslizantes sólidos, tais como por exemplo, ácido esteárico, estearato de magnésio; sulfato de cálcio; óleos vegetais, tais como por exemplo, óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de sésamo, azeite, óleo de milho e óleo de teobroma; polióis, tais como por exemplo, polipropilenoglicol, glicerol, sorbitol, manitol e polietilenoglicol; ácido algínico.

Outros aditivos que podem ser incluídos na composição farmacêutica da invenção são emulsionantes, tais como por exemplo, Tween®; humectantes, tais como por exemplo, laurilsulfato de sódio; corantes; agentes que conferem sabor, transportadores farmacêuticos; agentes de formação de comprimidos; estabilizantes; antioxidantes; conservantes.

De acordo com outra forma de realização, a composição farmacêutica da invenção pode compreender um adjuvante. Neste contexto, um adjuvante pode ser entendido como qualquer composto que seja adequado para iniciar ou aumentar uma resposta imunológica do sistema imunitário inato, *i. e.*, uma resposta imunológica não específica. Por outras palavras, quando administrada, a composição farmacêutica da invenção desencadeia tipicamente uma resposta imunológica inata devido ao adjuvante, ali opcionalmente contido. Um tal adjuvante pode ser seleccionado de qualquer adjuvante conhecido de um especialista e adequado para o presente caso, *i. e.*, que suporta a indução de

uma resposta imunológica inata num mamífero. De um modo preferido, o adjuvante pode ser seleccionado do grupo consistindo de, sem se limitar aos mesmos, qualquer um dos seguintes incluindo quitosano, TDM, MDP, dipéptido de muramilo, pluronics, solução de alúmen, hidróxido de alumínio, ADJUMER™ (polifosfazeno); gel de fosfato de alumínio; glucanos de algas; algamulina; gel de hidróxido de alumínio (alúmen); gel de hidróxido de alumínio de elevada absorção de proteína; gel de hidróxido de alumínio de baixa viscosidade; AF ou SPT (emulsão de esqualano (5%), Tween 80 (0,2%), Pluronic L121 (1,25%), soro fisiológico tamponado com fosfato, pH 7,4); AVRIDINE™ (propanodiamina); BAY R1005™ ((hidroacetato de N-(2-desoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecil-dodecanoil-amida); CALCITRIOL™ (1-alfa,25-di-hidroxi-vitamina D3); gel de fosfato de cálcio; CAPTM (nanopartículas de fosfato de cálcio); holotoxina da cólera, proteína de fusão do fragmento A-D da proteína A1 da toxina da cólera, subporção B da toxina da cólera; CRL 1005 (copolímero de bloco P1205); lipossomas contendo citocinas; DDA (brometo de dimetildioctadecilamónio); DHEA (desidroepiandrosterona); DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina); DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol); complexo de DOC/alúmen (sal de sódio do ácido desoxicólico); adjuvante completo de Freund; adjuvante incompleto de Freund; gama inulina; adjuvante de Gerbu (mistura de: i) N-acetilglucosaminil-(P1-4)-N-acetilmuramil-L-alanil-D-glutamina (GMDP), ii) cloreto de dimetildioctadecilamónio (DDA), iii) complexo de sal de zinco-L-prolina (ZnPro-8); GM-CSF); GMDP (N-acetilglucosaminil-(b1-4)-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina); ImmTher™ (dipalmitato de N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-glicerol); DRVs (imunolipossomas preparadas a partir de vesículas de desidratação-re-hidratação), interferção-gama;

interleucina-1beta; interleucina-2; interleucina-7;
interleucina-12; ISCOMS™; ISCOPREP 7.0.3.™; lipossomas;
LOXORIBINA™ (7-alil-8-oxoguanosina); adjuvante oral LT
(enterotoxina-prototoxina instável a *E.coli*); microesferas e
micropartículas de qualquer composição; MF59™; (emulsão de
esqualeno-água); MONTANIDE ISA 51™ (adjuvante incompleto de
Freund purificado); MONTANIDE ISA 720™ (adjuvante oleoso
metabolizável); MPL™ (3- α -desacil-4'-monofosforil-lípido A);
lipossomas de MTP-PE e MTP-PE ((N-acetil-L-alanil-D-
isoglutaminil-L-alanina-2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-
(hidroxifosforiloxi))-etilamida, sal monossódico); MURAMETIDE™
(Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH₃); MURAPALMITINE™ e D-MURAPALMITINE™
(Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln-sn-gliceroldipalmitoílo); NAGO
(neuraminidase-galactose oxidase); nanoesferas ou nanopartículas
de qualquer composição; NISVs (vesículas de tensioactivo não
iónico); PLEURAN™ (β -glucano); PLGA, PGA e PLA (homo- e
copolímeros de ácido láctico e ácido glicólico;
microesferas/nanoesferas); PLURONIC L121™; PMMA (metacrilato de
polimetilo); PODDS™ (microesferas proteináceas); derivados de
carbamato de polietileno; poli-rA: poli-rU (complexo de ácido
poliadenílico-poliuridílico); polissorbatato 80 (Tween 80);
coquelatos de proteína (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster,
AL); STIMULON™ (QS-21); Quil-A (saponina Quil-A); S-28463
(4-amino-otec-dimetil-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-
etanol); SAF-1™ ("formulação adjuvante Syntex");
proteolipossomas Sendai e matrizes de lípidos contendo Sendai;
Span-85 (trioleato de sorbitano); Specol (emulsão de Marcol 52,
Span 85 e Tween 85); esqualeno ou Robane® (2,6,10,15,19,23-
hexametiltetracosano e 2,6,10,15,19,23-hexametil-
2,6,10,14,18,22-tetracosa-hexano); esteariltirosina (cloridrato
de octadeciltirosina); Theramid® (N-acetilglucosaminil-N-
acetilmuramil-L-Ala-D-isoGlu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida);

Theronil-MDP (Termurtide™ ou [thr 1]-MDP; N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina); partículas Ty (Ty-VLPs ou partículas semelhantes a vírus); lipossomas de Walter-Reed (lipossomas contendo lípido A adsorvidos sobre hidróxido de alumínio) e lipopéptidos, incluindo Pam3Cys, em particular sais de alumínio, tais como Adju-phos, Alhydrogel, Rehydrogel; emulsões, incluindo CFA, SAF, IFA, MF59, Provax, TiterMax, Montanide, Vaxfectin; copolímeros, incluindo Optivax (CRL1005), L121, etc.; lipossomas, incluindo Stealth, cocleatos, incluindo BIORAL; adjuvantes derivados de plantas, incluindo QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM; adjuvantes adequados para coestimulação incluindo Tomatina, biopolímeros, incluindo PLG, PMM, Inulina; adjuvantes derivados de micróbios, incluindo Romurtide, DETOX, MPL, CWS, Manose, sequências CpG de ácido nucleico, CpG7909, ligandos de TLR 1-10 humano, ligandos de TLR 1-13 de murino, ISS-1018, IC31, Ampligen, Ribis29, IMOxine, IRIVs, VLPs, toxina da cólera, toxina termicamente instável, Pam3Cys, Flagelina, âncora GPI, LNFPIII/Lewis X, péptidos antimicrobianos, UC-1V150, proteína de fusão de RSV, cdiGMP; e adjuvantes adequados como antagonistas incluindo o neuropéptido CGRP.

A composição farmacêutica da invenção pode conter adicionalmente uma ou mais substâncias auxiliares a fim de aumentar ainda mais o seu efeito imunomodulador. De um modo preferido, é conseguida desse modo uma acção sinérgica das imidazoquinolin(aminas) ou um seu derivado, como definido de acordo com a presente invenção, e de uma substância auxiliar que pode estar opcionalmente contida na composição farmacêutica da invenção como descrita acima. Dependendo dos vários tipos de substâncias auxiliares podem ser considerados vários mecanismos a este respeito. Por exemplo, os compostos que permitem a maturação de células dendríticas (DC), por exemplo

lipopolissacáridos, TNF-alfa ou ligando CD40, formam uma primeira classe de substâncias auxiliares adequadas. Em geral, pode-se utilizar como substância auxiliar qualquer agente que influencie o sistema imunitário na maneira de um "sinal de perigo" (LPS, GP96, etc.) ou citocinas, tal como GM-CSF, as quais permitem que uma resposta imunológica produzida pelo adjuvante imunoestimulante de acordo com a invenção seja melhorada e/ou influenciado de um modo direccionado. As substâncias auxiliares particularmente preferidas são citocinas, tais como monocinas, linfocinas, interleucinas ou quimiocinas, que promovem ainda mais a resposta imunológica inata, tais como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, INF-alfa, IFN-beta, INF-gama, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta ou TNF-alfa, factores de crescimento, tais como hGH.

A composição farmacêutica da invenção pode conter também adicional ou alternativamente qualquer outro composto, que seja conhecido como sendo imunoestimulante devido à sua afinidade de ligação (como ligandos) para os receptores de tipo Toll humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 ou devido à sua afinidade de ligação (como ligandos) para os receptores de tipo Toll de murinos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 ou TLR13.

Outra classe de compostos que pode ser adicionada a uma composição farmacêutica da invenção neste contexto podem ser os ácidos nucleicos CpG, em particular CpG-ARN ou CpG-ADN. Um CpG-ARN ou CpG-ADN pode ser um CpG-ADN de cadeia simples (ss CpG-ADN), um CpG-ADN de cadeia dupla (dsADN), um CpG-ARN de

cadeia simples (ss CpG-ARN) ou um CpG-ARN de cadeia dupla (ds CpG-ARN). O ácido nucleico CpG está, de um modo preferido, na forma de CpG-ARN, de um modo mais preferido, na forma de CpG-ARN de cadeia simples (ss CpG-ARN). De um modo preferido, o ácido nucleico CpG contém pelo menos uma ou mais sequência(s) de dinucleótidos (mitogénicas) de citosina/guanina (motivo(s) CpG). De acordo com uma primeira alternativa preferida, pelo menos um motivo CpG contido nestas sequências, isto é a C (citosina) e a G (guanina) do motivo CpG, não está metilado. Todas as outras citosinas ou guaninas opcionalmente contidas nestas sequências podem estar metiladas ou não metiladas. No entanto, de acordo com uma outra alternativa preferida, a C (citosina) e a G (guanina) do motivo CpG pode estar também presente na forma metilada.

A composição farmacêutica da invenção compreende tipicamente um "quantidade segura e eficaz" dos componentes acima da composição farmacêutica da invenção, particularmente das imidazoquinolin(aminas) e seus derivados como definidos de acordo com a presente invenção. Como aqui utilizada, uma "quantidade segura e eficaz" significa uma quantidade deste componente, particularmente das imidazoquinolin(aminas) e seus derivados, que é suficiente para induzir significativamente uma modificação positiva de uma doença ou distúrbio como aqui definido. No entanto, ao mesmo tempo, uma "quantidade segura e eficaz" é pequena o bastante para evitar efeitos secundários graves, isto é, para permitir uma relação sensível entre vantagem e risco. A determinação destes limites assenta tipicamente no âmbito de discernimento médico sensível. Além disso, uma "quantidade segura e eficaz" dos componentes da composição farmacêutica da invenção, particularmente das imidazoquinolin(aminas) e seus derivados, variará de acordo com

o estado particular a ser tratado e também com a idade e condição física do doente a ser tratado, do peso corporal, saúde geral, género, dieta, tempo de administração, taxa de excreção, associação de fármacos, sua actividade, da gravidade do estado, da duração do tratamento, da natureza da terapia concomitante, da transportador particulado farmacêuticamente aceitável utilizado e factores semelhantes, dentro do conhecimento e experiência do médico assistente. A composição farmacêutica da invenção pode ser utilizada para fins médicos humanos e também para veterinários, de um modo preferido, para fins médicos humanos.

Sem se estar limitado a estas, em algumas formas de realização, a composição farmacêutica da invenção conterá ou libertará imidazoquinolin(amina) activa, ou um seu derivado, suficiente para proporcionar uma dose de cerca de 10, 20, 50 ou 100 nanogramas por quilograma (ng/kg) a cerca de 50 miligramas por quilograma (mg/kg), de um modo preferido, cerca de 10 microgramas por quilograma (µg/kg) a cerca de 5 mg/kg, do composto ou um seu sal ao indivíduo. Noutras formas de realização, a composição farmacêutica da invenção conterá ou libertará imidazoquinolin(amina) activa, ou um seu derivado, suficiente para proporcionar uma dose de, por exemplo, desde cerca de 0,0001, 0,001, 0,01 ou 0,01 mg/m² a cerca de 5,0 mg/m², calculada de acordo com o método de Dubois, em que a área da superfície corporal de um indivíduo (m²) é calculada utilizando o peso corporal do indivíduo: $m^2 = (\text{peso kg}^{0,425} \times \text{altura cm}^{0,725}) \times 0,007184$, embora em algumas formas de realização os métodos possam ser realizados administrando um composto ou sal ou composição numa dose fora desta gama. Em algumas destas formas de realização, o método inclui administrar imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, suficiente para

proporcionar uma dose desde cerca de 0,0001, 0,001, 0,01 ou 0,1 mg/m² a cerca de 2,0 mg/ m² ao indivíduo, por exemplo, uma dose desde cerca de 0,004, 0,04 ou 0,4 mg/m² a cerca de 1,2 mg/m².

A composição farmacêutica da invenção pode ser administrada por via local. Em geral, as vias para administração local incluem, por exemplo, as vias de administração tópica mas também injeções intravesicais, intradérmicas, transdérmicas, subcutâneas ou intramusculares, ou injeções intralesionais, intracranianas, intrapulmonares, intracardíacas e sublinguais. De um modo mais preferido, a composição farmacêutica da invenção pode ser administrada por uma via intravesical. A quantidade adequada da composição farmacêutica da invenção a ser administrada pode ser determinada por experiências de rotina com modelos animais. Tais modelos incluem, sem implicar qualquer limitação, modelos em coelho, ovelha, ratinho, rato, cão e primata não humano. As formas de dose unitária preferidas para injeção incluem soluções estéreis de água, soro fisiológico ou as suas misturas.

As seguintes formas de realização são composições especificamente preferidas da invenção que estão restringidas a componentes específicos.

A composição farmacêutica como definida acima compreende pelo menos uma imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido e, pelo menos, um ácido orgânico como definido acima seleccionado de ácido láctico - de um modo preferido, numa concentração tal que o seu pH final é de pH 3 a 5, de um modo preferido, 3,5 a 4,5. Desse modo, os componentes da composição da invenção formam as estruturas de aducto da invenção. A

composição farmacêutica como definida acima compreende, de um modo preferido, pelo menos uma imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido, e pelo menos um ácido orgânico como definido acima seleccionado de ácido láctico contendo, contudo, não mais do que 4, 3, 2, 1 ou, de um modo muito preferido, nenhum ácido orgânico e/ou inorgânico adicional como aqui definido ou, alternativamente, menos de 2 ácidos inorgânicos e nenhum outro ácido orgânico ou, ainda alternativamente, apenas um ácido orgânico adicional e nenhum ácido inorgânico.

De um modo preferido, a composição farmacêutica como definida acima compreende pelo menos uma imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido e, pelo menos, um ácido orgânico como definido acima seleccionado de ácido láctico, e menos de 4 ou 3 agentes termosensíveis ou de um modo mais preferido, apenas um agente termosensível. Alternativamente, a composição pode também compreender nenhum agente termosensível. É também proporcionada a combinação de um número restrito de agentes termosensíveis na composição farmacêutica e um número restrito de ácidos como definidos acima. Consequentemente, a composição farmacêutica como definida acima pode compreender e. g., pelo menos uma imidazoquinolin(amina) ou um seu derivado, como aqui definido, e pelo menos um ácido orgânico como definido acima seleccionado de ácido láctico, e menos de 4, 3, 2 ou 1 ácidos orgânicos e/ou inorgânicos adicionais como aqui definidos, e menos do que 4, 3, ou 2 agentes termosensíveis, de um modo preferido, todos eles pertencentes à classe de pluronics, de um modo mais preferido, aqueles compostos pluronic que são aqui definidos como sendo preferido, s.

De um modo preferido, a composição farmacêutica pode compreender nenhum tensioactivo além dos agentes termossensíveis (se é que algum), os quais podem ter adicionalmente propriedades tensioactivas. Consequentemente, a composição pode também compreender nenhum tensioactivo e nenhum agente termossensível.

De um modo preferido, a composição farmacêutica pode conter menos de 4, 3 ou 2 ciclodextrinas ou, alternativamente, nenhuma ciclodextrina de todo. Estas formas de realização podem ser combinadas com as formas de realização preferidas acima. Consequentemente, a composição da invenção pode, *e. g.*, não conter agente termossensível, nem ciclodextrina e nem tensioactivo. Além disso, a composição da invenção pode não conter qualquer intensificador de solubilidade adicional, seja ele um tensioactivo, uma ciclodextrina ou seja ele outro composto de melhoria da solubilidade, além do láctico.

De um modo preferido, a composição compreende pelo menos um composto de imidaziquinoli(amina) como aqui definido, ácido láctico e 1, 2 ou nenhum agente(s) termossensível(eis) e nenhum composto de melhoria de solubilidade adicional e nenhum ingrediente terapeuticamente activo adicional e nenhuma celulose ou derivado de celulose. Nessa forma de realização, a composição pode exclusivamente conter adicionalmente um ou mais dos seguintes componentes padrão pertencentes à classe de estabilizantes e conservantes.

De acordo com uma forma de realização específica, a composição farmacêutica compreende ácido láctico numa concentração de cerca de 0,025 a cerca de 0,2 M, imidazoquinolin(amina) numa quantidade de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 1% (p/v), ciclodextrina(s) numa quantidade de cerca de

2% (p/v) a cerca de 6% (p/v) e Poloxâmero 407 numa quantidade de cerca de 10% (p/v) a cerca de 25% (p/v), de um modo preferido, a composição farmacêutica da invenção compreende ácido láctico numa concentração de cerca de 0,075 a cerca de 0,125 M, e. g. de cerca de 0,08 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,085 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,09 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,095 M a cerca de 0,125 M, de cerca de 0,1 M a cerca de 0,125 M, ou de cerca de 0,075 M a cerca de 0,120 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,115 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,110 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,105 M, de cerca de 0,075 M a cerca de 0,105 M ou de cerca de 0,08 M a cerca de 0,120 M, e. g. de cerca de 0,085 M a cerca de 0,115 M, de cerca de 0,09 M a cerca de 0,110 M, de cerca de 0,095 M a cerca de 0,105 M, ou de cerca de 0,1 M, imidazoquinolin(amina) numa quantidade de cerca de 0,1% (p/v) a cerca de 1% (p/v), e. g., numa quantidade de cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ou 1,0(p/v), ciclodextrina(s) numa quantidade de cerca de 2% (p/v) a cerca de 6% (p/v), e. g. de cerca de 2,5% (p/v) a cerca de 6% (p/v), de cerca de 3% (p/v) a cerca de 6% (p/v), de cerca de 3,5% (p/v) a cerca de 6% (p/v), de cerca de 4% (p/v) a cerca de 6% (p/v), de cerca de 4,5% (p/v) a cerca de 6% (p/v), ou de cerca de 2,5% (p/v) a cerca de 5,5% (p/v), cerca de 3% (p/v) a cerca de 5,5% (p/v), de cerca de 3,5% (p/v) a cerca de 5,5% (p/v), de cerca de 4% (p/v) a cerca de 5,5% (p/v), de cerca de 4,5% (p/v) a cerca de 5,5% (p/v) ou de cerca de 5% (p/v), e Poloxâmero 407 numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 25% (p/v), e. g., numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 24% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 23% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 22% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 21% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 19%

(p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 12% (p/v) a cerca de 16% (p/v) ou, mais particularmente, numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 24% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 23% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 22% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 21% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 13% (p/v) a cerca de 16% (p/v) ou, mais particularmente, numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 24% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 23% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 22% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 21% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 14% (p/v) a cerca de 16% (p/v) ou, mais particularmente, numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 24% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 23% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 22% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 21% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 20% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 19% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 18% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 17% (p/v), numa quantidade de cerca de 15% (p/v) a cerca de 16% (p/v) ou numa quantidade de cerca de 16% (p/v).

De acordo com a presente invenção, o objectivo da presente invenção é resolvido pela utilização de imidazoquinolin(aminas) e seus derivados, como aqui definidos (para o fabrico de uma composição farmacêutica, e. g., como aqui definida,) para serem utilizados num método para o tratamento de doenças da bexiga, tais como por exemplo, cancro da bexiga e cistite.

A ressecção transuretral do tumor da bexiga e a imunoterapia intravesical adjuvante com BCG é o tratamento padrão para a NMIBC de elevado grau. No entanto, muitos doentes apresentam recorrência da doença e o impacto na progressão da doença é apenas limitado (Silvester FJ, Van der Meijden AP, Lamm DL. intravesical bacillus Calmetie-Guerin reduces the risk of progression in patients com superficial bladder cancer: a metaanalysis of the published results of randomized clinical trials. J Urol 2002; 168:196470) ou mesmo ausente (Malmström PU, Silvester RJ, Crawford ED, Friedrich M, Krege S, Rintala E, Solsona E, Di Stasi SM, Witjes JA. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomized studies comparing intravesical Mitomycin C versus Bacillus Caimettte-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. Eur Urol 2009; 56 (2):247256). Além do mais, o tratamento com BCG pode levar a efeitos secundários locais e sistémicos graves (Witjes JA, Palou J, Soloway M, Lamm O, Brausi M, Spermon JR, Persad R, Buckley R, Akaza H, Colombel M, Böhle A. Clinical Practice recommendations for the prevention and management of intravesical therapy-associated adverse events. Eur. Urol Suppl 2008; 7: 667-74). Consequentemente, são urgentemente necessários novas opções de tratamento terapêutico para melhorar as taxas de sucesso globais do tratamento, possivelmente com um perfil de toxicidade inferior, para cancros da bexiga invasivos de não-músculo.

Surpreendentemente, pôde demonstrar-se que as imidazoquinolin(aminas) administradas por via intravesical em porcos é bem tolerada, não provoca qualquer toxicidade na parede da bexiga e as formulações com poloxâmero e HP β CD permanecem mais tempo na bexiga com menos absorção sistémica. O perfil de segurança das imidazoquinolin(aminas) intravesicais compara favoravelmente com o das terapias actuais tal como o BCG.

Consequentemente, o objectivo da presente invenção é resolvido pela utilização de imidazoquinolin(aminas) e seus derivados como aqui definidos, (para o fabrico de uma composição farmacêutica, e. g., como aqui definida,) para o tratamento (intravesical) de doenças da bexiga, tais como por exemplo, cancro da bexiga, tais como por exemplo cancros da bexiga invasivos de não-músculo e cistite, etc. Para este fim específico, as imidazoquinolin(aminas) e seus derivados como aqui definidos são, de um modo preferido, proporcionados numa formulação como descrita acima para a composição farmacêutica da invenção.

Consequentemente, a presente invenção compreende ainda a utilização num método de tratamento de doenças da bexiga, tais como por exemplo, cancro da bexiga, tais como por exemplo cancros da bexiga invasivos de não-músculo e cistite. Neste contexto, uma tal utilização num método de tratamento como definido acima compreende, de um modo preferido, a administração da composição farmacêutica utilizando qualquer modo de administração como definido acima, incluindo, de um modo preferido, vias de administração tópica mas também injeções intravesicais, intradérmicas, transdérmicas, subcutâneas ou intramusculares ou injeções intralesionais, intracranianas, intrapulmonares, intracardiácas e sublinguais.

A presente invenção compreende métodos de tratamento (intravesical) de doenças da bexiga, tais como por exemplo, cancro da bexiga, tais como por exemplo cancros da bexiga invasivos de não-músculo e cistite, etc., utilizando a composição farmacêutica da invenção, de um modo preferido, como definida acima. Neste contexto, tais métodos de tratamento (intravesical) de doenças da bexiga compreende tipicamente a administração intravesical da composição farmacêutica da invenção. Além disso, a composição farmacêutica da invenção pode ser administrada utilizando métodos não invasivos, tal como uma agulha de injeção possuindo uma cânula de um diâmetro adequado, um tubo de injeção, métodos endoscópicos, etc.

É para ser entendido que esta invenção não está limitada à metodologia, protocolos e reagentes particulares aqui descritos, visto que estes podem variar. É também para ser entendido que a terminologia aqui utilizada é apenas para descrever formas de realização particulares e não se destina a limitar o âmbito da presente invenção, o qual estará limitado apenas pelas reivindicações apensas. A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm os mesmos significados conforme geralmente compreendidos por um técnico médio na matéria.

FIGURAS

As seguintes Figuras destinam-se a ilustrar adicionalmente a invenção. Estas não se destinam a limitar o objecto da invenção às mesmas.

- Figura 1** mostra a viscosidade de sistemas contendo percentagens diferentes de Poloxâmero 407 (20% e 25%) como uma função da temperatura.
- Figura 2** mostra a viscosidade de sistemas contendo percentagens diferentes de HP- β -CD (0% a 20%) como uma função da temperatura.
- Figura 3** mostra a viscosidade de sistemas contendo proporções diferentes de Poloxâmero 407 e Poloxâmero 188 (0% a 30%) como uma função da temperatura.
- Figura 4** (não está de acordo com a invenção) mostra a viscosidade de sistemas preparados com 20% de Poloxâmero 407 ou 25% de mistura de poloxâmeros numa solução de ácido acético (AA), em presença ou na ausência de imiquimod (TMX, 0,4%) como uma função da temperatura.
- Figura 5** (não está de acordo com a invenção) mostra a viscosidade de sistemas preparados com 20% de Poloxâmero 407 em água ou solução de ácido acético (AA), ou na presença de imiquimod (TMX) em solução de ácido acético como uma função da temperatura.
- Figura 6** (não está de acordo com a invenção) mostra a viscosidade de sistemas preparados com 25% de mistura de poloxâmeros (Poloxâmero 407 e Poloxâmero 188) em água ou solução de ácido acético, na presença de imiquimod (TMX) em

solução de ácido acético como uma função da temperatura.

Figura 7 mostra a viscosidade de sistemas preparados com 20% de Poloxâmero 407 (PG) ou 25% de mistura de poloxâmeros (Poloxâmero 407 e Poloxâmero 188, PPG) em solução de ácido láctico (LA), na presença e na ausência de imiquimod (TMX, 0,9%) como uma função da temperatura.

Figura 8 mostra a viscosidade de sistemas preparados com 20% de Poloxâmero 407 em água ou em solução de ácido láctico, ou na presença de imiquimod (TMX, 0,9) em solução de ácido láctico como uma função da temperatura.

Figura 9 mostra a viscosidade de sistemas preparados com a mistura de 25% de poloxâmero (Poloxâmero 407 e Poloxâmero 188) em água ou em solução aquosa de ácido láctico ou na presença de imiquimod (TMX, 0,9) em solução de ácido láctico como uma função da temperatura.

Figura 10 mostra o perfil de erosão (dissolução) de PG-LA1 (Poloxâmero 407 em solução de ácido láctico) sem imiquimod (topo) e com imiquimod (TMX PG-LA1) (fundo) ao longo do tempo.

Figura 11 mostra os perfis de difusão (g) de imiquimod (TMX) que passam a membrana de celulose em consequência das formulações de gel preparadas com ácido láctico 0,1 M e Poloxâmero 407 (PG) ou

mistura de Poloxâmero 407/Poloxâmero 188 (PPG): na mesma figura, a difusão de imiquimod (TMX) em solução de ácido láctico 0,1 M sem formulação de gel é dada para fins comparativos.

Figura 12 mostra a quantidade de imiquimod (TMX-101) recuperada do BE (epitélio da bexiga) após 4 horas de contacto com a formulação (ver Exemplo 5), nomeadamente para 0,9% de Imiquimod - 15% de HP- β -CD dissolvidos em solução de ácido láctico 0,1 M, ou em gel de Poloxâmero 407 a 19% contendo 15% de HP- β -CD (ácido láctico 0,1 M) ou em dispersão de lipossomas (1% de lecitina de soja em solução de ácido láctico 0,1 M). É mostrado que as formulações da invenção exibem um efeito consideravelmente melhor na libertação de longa duração do que a formulação lipossómica que é aqui dada para fins comparativos.

Figura 13 mostra a solubilidade de imiquimod (TMX-101) na presença de diferentes concentrações de ácido láctico. A solubilidade aumenta como uma função da concentração de ácido láctico.

Figura 14 Na parte de cima são mostradas bexigas de porcos que foram excisadas, lavadas e transferidas para solução de NaCl a 37 °C. As formulações de acordo com a invenção foram aplicadas na bexiga e a bexiga seccionada após 10 minutos. Foi observado o estado de gel da formulação aplicada. Na parte de baixo é mostrada a bexiga após adição de uma formulação da invenção compreendendo imiquimod e 20% de Poloxâmero 4077 em solução de ácido

lático (0,1 M)), a qual foi previamente corada com Azul de Coomassie, e o gel é ainda observado. Não é observada qualquer adesão do gel.

Figura 15 mostra a quantidade de imiquimod (TMX) recuperado do epitélio da bexiga (BE) após 4 horas de contacto com as diferentes formulações de imiquimod (os dados são normalizados para a área de absorção e são a média de 3 experiências).

Figura 16 mostra uma coloração imuno-histoquímica para TLR-7 da (sub)mucosa humana de cancro da bexiga de acordo com o exemplo 10.3.1 (ampliação original 40X).

Figura 17 mostra uma coloração imuno-histológica para TLR-7 da (sub)mucosa da bexiga do porco de acordo com o exemplo 10.3.1 (ampliação original 40X).

Figura 18 mostra os parâmetros farmacocinéticos plasmático do imiquimod (R-837) administrado a grupos de porcos tratados com diferentes formulações de imiquimod. Os animais receberam uma solução de imiquimod a 0,5% dissolvida em ácido láctico 0,1 M (grupo 1); uma solução de imiquimod a 0,5% dissolvida em ácido láctico 0,1 M, poloxâmero 407 a 16% como emulsionante e HP β CD (hidroxipropil- β -ciclodextrina) a 15% como estabilizante (grupo 2); uma solução de imiquimod a 0,5% dissolvida em ácido láctico 0,1 M, poloxâmero 407 a 16% e HP β CD a 5% (grupo 3).

- Figura 19** mostra o aspecto da (sub)mucosa normal de uma bexiga de porco (ampliação original 20X)
- Figura 20** mostra a reacção inflamatória submucosal linfocítica predominantemente moderada um dia após instilação do fármaco de estudo (grupo 3) do exemplo 10.3.2 (ampliação original 20X).
- Figura 21** mostra vasculite leucocitoclástica com necrose da parede de vaso fibrinóide na submucosa da bexiga de porco (grupo 1) do exemplo 10.3.2 (ampliação original 20X).
- Figura 22** mostra a indução de citocinas e quimiocinas pela administração intravesical de imiquimod em ácido láctico a 0,1% de acordo com o exemplo 11.3.1. Os ratinhos (n=8) receberam por via intravesical várias doses de imiquimod em formulação de ácido láctico. Duas horas após administração foram recolhidos os soros e lavagem da bexiga. Foram medidos os níveis de TNF α (A) e KC (B) no soro, e TNF α (C) e KC (D) na lavagem da bexiga. Os dados mostrados são representativos de duas experiências independentes (média \pm EPM.). * denota $p < 0,05$ em comparação com os ratinhos tratados com veículo (Veh) por testes ANOVA unifactoriais com teste post hoc de Dunnett.
- Figura 23** mostra a farmacocinética de imiquimod (R-837) em ratinhos após administração intravesical de

acordo com exemplo 11.3.2. (A-D) Os ratinhos (n=8) foram administrados com 5000 nmoles de imiquimod em formulação de ácido láctico ou poloxâmero. Foram medidos os níveis de TNF α no soro (A), TNF α na lavagem da bexiga (B), KC no soro (C) e KC na lavagem da bexiga (D). * denota $p < 0,01$ avaliado pelo teste t de Student não emparelhado. (E) Os ratinhos (n=6 a 8) foram administrados com 1500 nmoles de imiquimod em formulação de ácido láctico ou poloxâmero. Os soros foram recolhidos 2, 4, 6, 24 horas após a administração. (F) Os ratinhos (n=6) foram administrados com várias doses de imiquimod em 100 μ L de formulações de ácido láctico ou poloxâmero. Os soros foram recolhidos 2 a 4 horas após a administração. Os níveis de imiquimod foram determinados por Chiman SRL. Os dados mostrados são valores agrupados de duas experiências independentes (média \pm EPM.). * denota $p < 0,05$ por testes ANOVA unifactoriais com teste post hoc de Dunnett em comparação com os ratinhos tratados ao ponto no tempo de 0 horas ou ratinhos tratados com veículo sozinho (Veh). ** denota significância estatística ($p < 0,01$) avaliada por testes ANOVA unifactoriais com teste post hoc de Bonferroni.

Figura 24 mostra que a incorporação de HP β CD restabelece parcialmente os níveis sistêmicos de TNF α e KC de acordo com o exemplo 11.3.3. Os ratinhos (n=8) foram administrados com 1500 nmoles de imiquimod em formulação de ácido láctico, poloxâmero ou

poloxâmero-HP β CD. São mostrados os níveis de TNF α (A) e KC (B). Os dados apresentados são valores agrupados de duas experiências independentes (média \pm EPM). * denota $p < 0,05$ por testes ANOVA unifactoriais com teste post hoc de Dunnett. (C) Ratinhos C57BU6 foram injectados com 5000 nmoles de imiquimod em formulações de ácido láctico, poloxâmero ou poloxâmero-HP β CD. Os níveis de KC na lavagem foram avaliados pelo ensaio de esferas Luminox. Os dados apresentados são valores agrupados de três experiências independentes (média \pm EPM.).

Figura 25 mostra a histologia representativa da bexiga de de murinos tratados com 0,1% de imiquimod (R-837) em formulação de poloxâmero-HP β CD de acordo com o exemplo 11.3.4. A: Tratamento simples com Veh (C57BL/6 de tipo selvagem) B: Tratamento em três vezes com Veh (C57BL/6 de tipo selvagem) C: Tratamento simples com imiquimod (C57BL/6 de tipo selvagem) D: Tratamento em três vezes com imiquimod (C57BU6 tipo selvagem) E: Tratamento em três vezes com soro fisiológico (C57BU6 de tipo selvagem) F: Tratamento em três vezes com imiquimod (TLR7 ko) C57BU6 (A-E) ou ratinhos com deficiência de TLR7 (ko) (F) foram tratados por via intravesical com 0,1% de imiquimod em formulação de poloxâmero-HP β CD no dia 0 (tratamento simples), 50 μ L nos dias 0, 4 e 8 (tratamento em três vezes). As bexigas foram recolhidas no dia 1 para os tratamento simples (A e C) ou no dia 9 para o tratamento em três vezes

(B, D, E e F) e coradas com H&E. Os ratinhos tratados com veículo sozinho (Veh, n=4) e ratinhos naturais serviram como controlos (B e E). Barra de escala: 100µm. Ampliação original foi de 200x.

Figura 26 mostra o peso reduzido da bexiga de ratinhos portadores de MB49 tratados com 0,1% de imiquimod em formulação de poloxâmero-HPβCD de acordo com o exemplo 11.3.5. Os ratinhos (n=11) portadores de tumor da bexiga MB49 receberam por via intravesical 50 µL de 0,1% de imiquimod em formulação de poloxâmero-HPβCD nos dias 3, 6 e 9. Os ratinhos foram sacrificados no dia 11 e foi medido o peso da bexiga. Os ratinhos naive sem implantação de tumor (natural), ratinhos implantados com MB49 sem qualquer tratamento (Nenhum) ou ratinhos tratados com veículo (Veh) serviram como controlos. Os dados mostrados são valores agrupados de três experiências independentes (média ± EPM.). A significância estatística foi avaliada por testes ANOVA unifactoriais com teste de Kruskal-Wallis.

EXEMPLOS

Os Exemplos seguintes destinam-se a ilustrar adicionalmente a invenção. Eles não se destinam a limitar o objecto da invenção aos mesmos.

1. Exemplo: Solubilidade de imiquimod

1.1. Testes preliminares

1.1.1. Solubilidade de imiquimod em ácido clorídrico

Foram pesados 48 mg de imiquimod e adicionadas soluções de ácido clorídrico a diferentes concentrações: em particular 48,2 mg de imiquimod foram tratados com 8 mL de ácido clorídrico 0,1 N, 48,6 mg de imiquimod com 9 mL de ácido clorídrico 0,2 N e 48,4 mg de imiquimod com 8 mL de ácido clorídrico 2 N. Após agitação em vórtice durante 5 minutos, as amostras foram visualmente inspeccionadas.

O fármaco é ligeiramente solúvel em ácido clorídrico 0,1 N, 0,2 N e 2 N. O sistema preparado com HCl 2 N é uma solução transparente a 74 °C. A concentração teórica do fármaco dissolvido na mesma foi 0,042 M correspondente a 1,0%.

1.1.2. Solubilidade de imiquimod em ácido acético glacial

Uma quantidade pesada de fármaco (48,2 mg) foi dissolvida sob agitação em 2 mL de ácido acético glacial. Após solubilização completa uma alíquota pesada de imiquimod (150 mg) foi adicionada a esta solução para avaliar visualmente a concentração máxima de fármaco dissolvido. Esta experiência preliminar demonstra que é possível solubilizar 10 g de imiquimod em 100 mL de ácido acético a 100% à temperatura ambiente (10% (p/v)).

1.1.3. Solubilidade de imiquimod em tampões

Foi determinada a solubilidade de imiquimod a diferentes valores de pH. Foram usados dois procedimentos diferentes. O fármaco foi disperso no tampão (sem ácido acético como co-solvente). Foram dispersos 72 mg de imiquimod com 10 mL de tampão de citrato, 155 mg de imiquimod em 10 mL de tampão de fosfato e 192 mg em 10 mL de tampão de acetato. Após agitação em vórtice durante 5 minutos, cada amostra foi visualmente inspeccionada.

O imiquimod foi completamente dissolvido em ácido acético glacial e 1 mL desta solução (2,41% de imiquimod) foi diluído com 9 mL de água, 0,9% p/p de solução de NaCl, tampão de fosfato pH 7,0 (0,1 M), tampão de citrato pH 6,0 (0,1 M) ou tampão de acetato pH 5,0 (0,1 M). Foi realizada uma inspeção visual dos sistemas.

Os resultados destes testes preliminares indicam que o imiquimod é ligeiramente solúvel em tampões. Quando o fármaco foi dissolvido em ácido acético glacial e, em seguida, diluído com tampões foram obtidas soluções claras, transparentes: o pH destes sistemas foi sempre inferior a 3,6.

1.2. Análise de imiquimod

1.2.1. Curva de calibração de imiquimod em ácido acético por espectrofotometria

Uma quantidade pesada de fármaco (0,0124 g) foi dissolvida em 100 mL de solvente (ácido acético/água 1:9). A concentração

da solução era de 0,0005 M. Quantidades diferentes desta solução foram oportunamente diluídos com o mesmo solvente para preparar cinco soluções padrão com concentrações que vão desde 2×10^{-6} – 5×10^{-5} M (em particular 2×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 10×10^{-6} M, 20×10^{-6} M, 50×10^{-6} M). Estas soluções foram analisadas espectrofotometricamente. A absorvância foi determinada a três comprimentos de onda (250, 305, 319 nm).

As concentrações das soluções padrão utilizadas para calibração do método e os valores de absorvância correspondentes a 319, 305 e 250 nm são mostrados na Tabela 1 abaixo.

Concentração (10^{-6} mol/L)	Abs		
	$\lambda = 319$ nm	$\lambda = 305$ nm	$\lambda = 250$ nm
2,0	0,0308	0,0254	0,0652
5,0	0,0669	0,0625	0,2853
10,0	0,13,29	0,1146	0,4213
20,0	0,2548	0,2082	0,6687
50,0	0,6164	0,4858	1,3974

Tabela 1: Concentrações e valores de absorvância de soluções padrão de imiquimod.

1.2.2. Curva de calibração de imiquimod em ácido acético por HPLC

Uma quantidade pesada de imiquimod (0,0316 g) foi dissolvida em 250 mL de solvente (acetonitrilo (ACN)/água, pH 3,5). A concentração da solução era de 0,0005 M. Quantidades diferentes desta solução foram apropriadamente diluídas com o

mesmo solvente para preparar soluções padrão com concentrações na gama de 2×10^{-6} – 3×10^{-5} M (em particular 2×10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 10×10^{-6} M, 20×10^{-6} M, 30×10^{-6} M). Estas soluções foram analisadas por HPLC em relação ao imiquimod.

As amostras foram analisadas nas seguintes condições:

- Coluna: Symmetry Shield RP18 (150 × 4,6 mm, 3,5 μ m)
- Pré-coluna: Symmetry C18 (3,9 × 20 mm, 5 μ m)
- Fase móvel: Solução A: Acetonitrilo

Solução B: solução contendo acetato de amónio 50 mM (3,85 g em 1L de água)

- Caudal (mL/min): 1,0
- Gradiente: ver Tabela 2
- Temperatura do forno (°C): 40
- Comprimento de onda (nm): 250
- Volume de injeção (μ L): 20

tempo (minutos)	solução A (%)	solução B (%)	eluição
0	20	80	equilíbrio
0-16	20-30	80-70	gradiente linear
16-18	30	70	isocrático
18-26	30-50	70-50	gradiente linear
26-31	50-80	50-20	gradiente linear
31-40	80	20	isocrático
40-42	80-20	20-80	gradiente linear
42-50	20	80	reequilíbrio

Tabela 2: Gradiente para calibração por HPLC

Nestas condições de análise o tempo de retenção do imiquimod foi de 18 minutos.

As concentrações das soluções padrão utilizadas para calibração do método e as áreas dos picos correspondentes são mostradas na Tabela 3 abaixo.

Concentração (10^{-6} mol/L)	Área (U.A.)
2,0	55868,98
3,0	74818,33
10,0	262028,00
20,0	526459,49
30,0	824246,64

Tabela 3: Concentrações e áreas dos picos de soluções padrão de imiquimod.

1.3. Estudo de solubilidade

1.3.1. Solubilidade de imiquimod em ácido acético glacial e tampões

Conforme relatado a solubilidade de imiquimod em ácido acético glacial, à temperatura ambiente, foi de 100 mg/mL (10% p/v).

A solubilidade foi determinada experimentalmente pesando 1200 mg de fármaco, adicionando 10 mL de ácido acético glacial e agitando suavemente a dispersão durante 24 horas. Após filtração (filtro de membrana de 0,22 μ m da Millipore), esta amostra foi analisada por HPLC quanto ao teor de imiquimod e o seu pH foi medido.

O imiquimod (738 mg) foi inicialmente dissolvido em ácido acético glacial (10 mL). Um volume desta solução foi apropriadamente diluído com tampão de fosfato pH 7,0 (0,1 M), tampão de citrato pH 6,0 (0,1 M) ou tampão de acetato pH 5,0 (0,1 M) para preparar sistemas contendo 2,0% de fármaco. As amostras, após filtração por filtro de membrana de 0,22 µm da Millipore, foram analisadas espectrofotométrica e cromatograficamente quanto ao teor de imiquimod. Foi determinado o pH.

Os valores de solubilidade do fármaco em ácido acético glacial ou em ácido acético diluído com tampões de fosfato, citrato ou acetato (0,1 M) determinados por HPLC e/ou espectrofotometria e os valores de pH correspondentes são mostrados na Tabela 4.

Porcentagem de				Imiquimod (%p/v)		
ácido acético glacial	tampão de fosfato pH 7,0	tampão de citrato pH 6,0	tampão de acetato pH 5,0	UV	HPLC	pH
100					7,50	
27	73			1,55	1,69	2,92
27		73		0,72	0,86	3,20
27			73	1,92	1,89	2,92

Tabela 4: Composições, solução pH e solubilidade de imiquimod de sistemas

1.3.2. Solubilidade de imiquimod em ácidos de cadeia curta

Alguns ácidos inorgânicos e orgânicos foram considerados como solubilizantes potenciais do fármaco. Foram dissolvidos

100 mg de imiquimod em 10 mL de ácido fosfórico 0,1 M, ácido succínico 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, ácido acético 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M e ácido láctico 0,01 M, 0,05 M, 0,088 M e 0,1 M. Após filtração, estes sistemas foram analisados espectrofotometricamente quanto ao imiquimod e o seu pH foi medido.

1.3.3. Solubilidade de imiquimod na presença de ciclodextrina

Quantidades pesadas com exactidão de imiquimod (200 mg) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) (4000 mg) foram dissolvidas em 10 mL de:

- água
- água a pH 5,0 (corrigido com HCl)
- água a pH 3,0 (corrigido com HCl)
- solução de láctico ácido (0,1 M)

Depois de agitar durante 24 horas e filtrar (filtro de membrana de 0,22 μ m da Millipore) o imiquimod solubilizado foi determinado espectrofotometricamente. Foi também medido o pH da solução.

1.3.4. Solubilidade de imiquimod em presença de tensioactivos

O imiquimod (200 mg) foi pesado e misturado com quantidades diferentes de tensioactivos (Tween 20, Tween 80, Cremophor EL ou Pluronic F-68) para preparar formulações contendo 0,5, 2,5 e 5%

de tensioactivo. Cada mistura foi adicionada a 10 mL de ácido láctico (0,1 M), agitada suavemente durante 24 horas, filtrada e analisada por espectrofotometria e submetida a medição de pH.

O imiquimod presente em solução nas composições preparadas com ácidos e tensioactivos diferentes é determinado espectrofotometricamente e é mostrado na Tabela 5 em conjunto com o valor de pH.

Ácido (M)					excipiente (%)					imiquimod (%p/v)	pH
ácido fosfórico	ácido succínico	ácido cítrico	ácido acético	ácido láctico	Tween 20	Tween 80	Cremophor EL	Pluronic F68	HP- β-CD		
0,100										0,159	1,80
	0,100									0,079	2,94
		0,100								0,010	2,10
			0,010							0,070	4,37
			0,050							0,220	4,08
			0,100							0,430	3,97
				0,010						0,130	4,20
				0,050						0,530	3,90
				0,088						0,840	3,71
				0,100						0,980	3,61
				0,100	0,5					0,945	3,88
				0,100	2,5					1,004	3,86
				0,100	5,0					1,001	3,89
				0,100		0,5				0,997	3,83
				0,100		2,5				1,009	3,82
				0,100		5,0				0,872	3,82
				0,100			0,5			0,881	3,90
				0,100			2,5			0,989	3,87

(continuação)

Ácido (M)					excipiente (%)					imiquimod (%p/v)	pH
ácido fosfórico	ácido succínico	ácido citríco	ácido acético	ácido lático	Tween 20	Tween 80	Cremophor EL	Pluronic F68	HP- β-CD		
				0,100			5,0			0,969	3,88
				0,100				0,5		1,048	3,85
				0,100				2,5		1,088	3,87
				0,100				5,0		0,972	3,89
									40,0	0,004	7,09
									40,0	0,143	5,17
									40,0	0,655	3,05
				0,100					40,0	1,141	4,46

Tabela 5: Composição, valor de pH e quantidade de imiquimod nas formulações

1.3.5. Solubilidade de imiquimod em glicerol ou propilenoglicol

O imiquimod foi pesado (100 mg) e adicionado a glicerol ou propilenoglicol até um volume de 10 mL. Depois de agitar (a 120 °C durante 24 horas) e arrefecer, foram adicionados 10 mL de água: as dispersões foram filtradas e foi determinada a quantidade de imiquimod nas fases líquidas. O sistema preparado com glicerol como solvente mostrou um valor de pH de 5,42 e uma concentração de imiquimod de 0,02%. Quando foi utilizado propilenoglicol o pH foi de 3,03 e a concentração de imiquimod em solução foi de 0,02%.

1.4. Discussão dos resultados

O imiquimod é apreciavelmente solúvel em ácido acético e láctico puro (>7,5% p/v). Estes dois ácidos podem ser utilizados como co-solventes para preparar formulações contendo uma quantidade relativamente elevada da substância activa.

Entre os ácidos considerados como solubilizantes para o imiquimod, os ácidos acético e láctico confirmam a sua aptidão para interagir com o fármaco e solubilizá-lo. A quantidade de fármaco em solução está directamente relacionada com a concentração de ácido (isto é também confirmado pelo Exemplo 6.1.). Como solubilizante, o ácido láctico é mais eficiente do que o ácido acético.

Os tensioactivos associados a ácido láctico não melhoram a solubilidade do imiquimod. Os resultados obtidos demonstram que, para estes sistemas, a solubilidade do fármaco depende

principalmente do ácido láctico e indicam que o fármaco não é retido nas micelas que os tensioactivos formam.

Sobre o agente de inclusão, embora tenha sido utilizada uma única concentração de HP- β -CD, pode afirmar-se que este agente de complexação não modifica substancialmente a solubilidade do fármaco: as concentrações crescentes observadas nas diferentes experiências são devidas à diminuição do valor de pH.

Quando foi utilizada HP- β -CD em associação com ácido láctico pôde ser observado um incremento pequeno, mas significativo (cerca de 18%) da solubilidade.

2. Exemplo: Formulações de gel termorreversíveis de imiquimod

2.1. Formulações de sistemas semi-sólido

2.1.1. Formulações com Poloxâmero 407

O Poloxâmero 407 foi utilizado para preparar sistemas semi-sólidos que continham como fase líquida:

- água
- solução de ácido acético a 10%
- solução de ácido acético 0,1 M
- solução de ácido láctico 0,1 M

Todos os sistemas eram constituídos por 25% de polímero (quantidade total/concentração de agente termossensível)

2.1.2. Formulações com Poloxâmero 407 e hidroxipropilmetilcelulose (não está de acordo com a invenção)

Foi avaliado o efeito de um derivado de celulose, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC - Methocel KL5M, Colorcon, PM 15000), nas propriedades termogelificantes do poloxâmero: a HPMC pura mostra transição de fase de gel entre 40 e 50 °C e a sua Temperatura de Solução Crítica Inferior (LCST) pode ser diminuída por modificação química (reduzindo o grau de substituição, a temperatura de transição de gel pode ser diminuída a cerca de 40 °C). Foram utilizadas quantidades diferentes deste polímero: a composição de formulações contendo HPMC é a seguinte:

Composição (%)		
Poloxâmero 407	HPMC	água
25	0	75,0
25	0,5	74,5
25	1,0	74
25	2,0	73

Tabela 6: Composições contendo HPMC

Como uma consequência, a adição de derivados de celulose não modificam significativamente o comportamento reológico das formulações.

2.1.3. Formulações com Poloxâmero 407 e ciclodextrina (não está de acordo com a invenção)

A literatura descreve a utilização de ciclodextrina como componente de sistemas semi-sólidos termossensíveis (CDG.

Palmieri *et al.*, 15th Int. Symp. on Microencapsulation, Parma, Itália, 18-21 de Setembro de 2005). Foi utilizada hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) a percentagens elevadas variando de 0 a 20% em sistemas constituídos por Poloxâmero 407 e água e foi determinada a LCST destas formulações.

2.1.4. Formulações com poloxâmero e Poloxâmero 188 (não está de acordo com a invenção)

Foram também avaliadas misturas de poloxâmeros como sistemas gelificantes. O Poloxâmero 188, copolímero de PEO-PPO-PEO com um PM inferior ao Poloxâmero 407, pode ser utilizado para modular a LCST do gel. O Poloxâmero 407 foi, em parte, substituído por Poloxâmero 188 para obter hidrogeles que contêm uma quantidade de polímeros correspondente a 25%.

Composição (%)			Proporção de polímero
Poloxâmero 407	Poloxâmero 188	água	
23,75	1,25	75	9,5/0,5
22,50	2,5	75	9/1
21,25	3,75	75	8,5/1,5
21	4	75	8/2

Tabela 7: Diferentes misturas de poloxâmeros

2.1.5. Formulações com poloxâmeros e ácido láctico ou acético (não está de acordo com a invenção)

A fase líquida (água) foi substituída por ácido láctico ou acético: foram avaliados os seus efeitos e aqueles do fármaco no comportamento reológico de sistemas termossensíveis. Entre as

diferentes formulações de gel preparadas com ácidos orgânicos (ácido láctico ou acético) foram consideradas aquelas que mostram temperaturas de transição de gel a cerca de 20 °C. Assim, os sistemas gelificados que as requerentes seleccionaram continham:

- 20% p/p de Poloxâmero 407
- 25% p/p de Poloxâmero 407/Poloxâmero 188 (proporção em peso de 9:1)

2.1.6. Formulações com imiquimod

A composição dos geles investigados foi a seguinte:

Imiquimod PPG-LA 01

Imiquimod	0,90 g
Poloxâmero 407	22,50 g
Poloxâmero 188	2,50 g
Solução de ácido láctico (0,135 M)	74,02 g

Imiquimod PG-LA 01

Imiquimod	0,90 g
Poloxâmero 407	20,00 g
Solução de ácido láctico (0,125 M)	79,02 g

Imiquimod PPG-AA 01 (não está de acordo com a invenção)

Imiquimod	0,40 g
Poloxâmero 407	22,50 g
Poloxâmero 188	2,50 g
Solução de ácido acético (0,135 M)	74,02 g

Imiquimod PG- AA01 (não está de acordo com a invenção)

Imiquimod	0,40 g
Poloxâmero 407	20,00 g
Solução de ácido acético (0,125 M)	79,02 g

2.2. Influência dos componentes na temperatura de solução crítica inferior (LCST)

Os valores de LCST não podem ser determinados por DSC: enquanto os sistemas constituídos por Poloxâmero 407 puro exibiram um pico endotérmico que pode estar ligado à transição de gel, ao utilizar misturas de poloxâmeros, HP- β -CD/Poloxâmero 407 ou HPMC/Poloxâmero 407 como agentes gelificantes, o sinal de transição de DSC foi perdido. Assim, a temperatura de transição de gel foi determinada por medição da viscosidade. A viscosidade dos sistemas foi avaliada na gama de temperatura 1-40 °C, utilizando um Reómetro BROOKFIELD DV-II+, munido de Adaptador de Amostra Pequena e o fuso S-25.

2.2.1. Viscosidade de sistemas contendo quantidades diferentes de Poloxâmero 407

Ao diminuir a percentagem de polímero, a LCST aumentava (ver Figura 1): a concentração mais baixa de poloxâmero, as micelas requerem um excesso de energia para estabelecer interações que dão consistência semi-sólida à formulação. A LCST dos geles contendo 20 ou 25% de Poloxâmero 407 e água como solvente são 19,93 e 13,9 °C, respectivamente. Estes resultados são coerentes com aqueles descritos na literatura [A. Cabana. *Et al.*, Study of the Gelation Process of Polyethylene Oxide-Polypropylene Oxide-Polyethylene Oxide Copolymer (Poloxamer 407) Aqueous Solutions, J. COLLOID INTERFACE SCI. 190, 307-312 (1997)].

2.2.2. Viscosidade of sistemas contendo poloxâmero e HPMC

Determinou-se que a HPMC, na gama de concentrações considerada ($\leq 2\%$), não modifica a temperatura de transição de gel da formulação contendo Poloxâmero 407 puro.

2.2.3. Viscosidade de sistemas contendo poloxâmero e ciclodextrina

Percentagens crescentes de ciclodextrina (HP- β -CD) conduziram a um aumento ligeiro, mas significativo da LCST: os resultados obtidos indicam uma relação não linear entre a concentração de CD e a viscosidade. Uma vez que a CD aumenta a solubilidade do fármaco (cerca de 17% de incremento) pode ser considerada a utilização deste componente na formulação de gel

final (não foram realizadas medições em sistemas contendo o fármaco) (ver Figura 2).

2.2.4. Viscosidade de sistemas contendo uma mistura de Poloxâmero 407 e 188

Foi observado um efeito relevante do Poloxâmero 188 na LCST: o aumento da proporção deste componente aumenta a temperatura de transição de gel (observe a relação linear entre a concentração de P188 e a viscosidade do sistema) (ver Figura 3).

2.2.5. Viscosidade de sistemas contendo ácido acético, ácido láctico e imiquimod

Pode ser apreciado que, independentemente do sistema gelificante, o ácido acético aumenta a LCST do sistema: este componente ácido aumenta a LCST de imiquimod PG-AA 01 e imiquimod PPG-AA 01 para 22,85 °C. O imiquimod não modifica significativamente a temperatura de transição de gel (22,95 e 23,00 °C para imiquimod PG-AA 01 e imiquimod PPG-AA 01, respectivamente) (Figuras 4, 5, 6).

O ácido láctico também aumenta a LCST das formulações de gel: como anteriormente observado com o ácido acético, a temperatura de transição de gel de sistemas constituídos por Poloxâmero 407 é de 23,8 °C. Com a mistura de Poloxâmero 407/Poloxâmero 188, em presença de ácido láctico, este valor é ainda mais elevado (=25,9 °C) (Figuras 7, 8, 9).

Ao contrário do ácido acético, o imiquimod afecta significativamente a LCST de sistemas preparados com ácido láctico: para a formulação imiquimod PG-LA 01 (Poloxâmero 407 puro), o fármaco leva a um aumento ligeiro, adicional da temperatura de transição de gel (Figura 8); quando foi utilizada a mistura de componentes gelificantes, a temperatura diminuiu para 24,1 °C (LCST do gel na ausência de fármaco = 25,9 °C) (Figura 9).

3. Exemplo: Teste de dissolução/Erosão e experiências de libertação de formulações contendo imiquimod

3.1. Composições e condições experimentais

3.1.1. Composições

Foi realizado um teste de dissolução/erosão exploratório nas seguintes formulações:

Imiquimod PG-LA 01

Imiquimod	0,90 g
Poloxâmero 407	20,00 g
Solução de ácido láctico (0,125 M)	79,02 g

PG-LA01

Poloxâmero 407	20,00 g
Solução de ácido láctico (0,125 M)	79,02 g

3.1.2. Condições experimentais

O teste é ilustrado em "Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gels formulations of ceftiofur" de L. Zhang -J. Control. Release, 85 (2002) 73-81. O teste foi realizado em frasquinhos de 10 mL, fechados com um elastomérico. Uma quantidade pesada de cerca de 3 g de formulação como solução coloidal (temperatura = 4 °C) foi transferida para o frasquinho e o frasquinho foi armazenado a 37 °C até gelificar. Depois disso, o frasquinho foi pesado, 2 mL de tampão de acetato (pH 6,0; 0,1 M) foram estratificados sobre o gel. A intervalos de tempo predeterminados (após 1, 2, 3, 4 horas) a fase líquida foi completamente removida e o frasquinho pesado. Tampão de acetato fresco foi estratificado sobre o gel remanescente. A diferença de peso do frasquinho após cada intervalo de tempo corresponde à quantidade de gel solubilizado pelo tampão. A percentagem de gel dissolvido foi descrita como uma função do tempo.

Para comparação, foi considerado um gel estudado por Zhang (J. Control. Release, 85 (2002) 73-81): este foi o sistema de gel de 25% de Poloxâmero 407 contendo ceftiofur.

3.2. Resultados e discussão

Os resultados obtidos são representados na Figura 10 (os valores são a média de três réplicas). Pode verificar-se que o perfil de erosão dos sistemas considerados são muito semelhantes ($p > 0,973$), indicando que o fármaco não afecta a erosão do polímero. a dissolução/erosão de ambos os sistemas foi um processo cinético de ordem zero, quase até 4 horas (cerca de 40% de erosão): uma cinética idêntica foi observada por Zhang, mas a velocidade do processo foi maior (cerca de $0,26\% \text{ min}^{-1}$) do que a obtida pela requerente (cerca de $0,19\% \text{ min}^{-1}$). Zhang observou que o pH do meio de dissolução tinha uma influência insignificante na dissolução do gel e utilizou soluções de tampão de fosfato de pH diferente como solvente para o polímero. As actuais observações poderiam estar associadas ao pH baixo das formulações ou às interacções do ácido láctico com o poloxâmero.

Além disso, durante a experiência de dissolução/erosão com a formulação de imiquimod PG-LA 01, não pôde ser observada qualquer separação/precipitação do fármaco.

4. Exemplo: Experiências de difusão/libertação de imiquimod

4.1. Composições e condições experimentais

4.1.1. Composições

Imiquimod PPG-LA 01

Imiquimod	0,90 g
Poloxâmero 407	22,50 g
Poloxâmero 188	2,50 g
Solução de ácido láctico (0,135 M)	74,02 g

Imiquimod PG-LA 01

Imiquimod	0,90 g
Poloxâmero 407	20,00 g
Solução de ácido láctico (0,125 M)	79,02 g

PG-LA01

Poloxâmero 407	20,00 g
Solução de ácido láctico (0,125 M)	79,02 g

4.1.2. Condições experimentais

As experiências de difusão/libertação de imiquimod foram realizadas com células de Franz com uma área de difusão eficaz de 1,76 cm² e um volume de compartimento receptor de 14 mL: o compartimento doador continha cerca de 2 g de formulação de gel, enquanto o receptor foi cheio com solução de ácido láctico 0,1 M

(pH = 3,5). Entre os dois compartimentos foi interposta uma membrana de acetato de celulose (MWCO = 23000). As experiências foram realizadas a 37 °C utilizando um banho de recirculação e o fluido na câmara receptora foi agitado continuamente a 300 rpm.

Em intervalos de tempo prefixados, a fase receptora foi completamente retirada e substituída por solução ácida fresca. A solução receptora foi submetida a análise por UV em relação ao imiquimod.

4.2. Resultados e discussão

O fluxo de imiquimod através da barreira artificial é alto ($1,95 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) e constante (durante quase a primeira hora) sugerindo que a transferência do fármaco através da membrana não afecta a cinética do imiquimod através dos geles de poloxâmero.

Os perfis de imiquimod das formulações de gel são muito diferentes daquele da solução, mas muito semelhantes entre eles. O imiquimod difunde através da matriz de gel com uma taxa relativamente elevada: após 6 horas, cerca de 44,4% da formulação de imiquimod PG-LA 01 e cerca de 48,3% da Imiquimod PPG-LA01 estava na fase receptora da célula de Franz. Os perfis de difusão do fármaco para ambas as formulações de gel são lineares, sugerindo cinéticas de ordem pseudo-zero: os fluxos de imiquimod através da matriz de gel são $2,00 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ para o sistema imiquimod PG-LA 01 e $2,19 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ para o sistema imiquimod PPG-LA01 (Figura 11).

Estas observações levam à conclusão que a taxa de difusão do fármaco através de ambos os sistemas examinados não difere significativamente e demonstram que a composição do material gelificante não tem qualquer efeito relevante na difusão do imiquimod no gel: as dimensões moleculares pequenas (baixo peso molecular) do activo favorecem o seu movimento através da estrutura micelar do gel.

À medida que a experiência prossegue, o polímero dissolve-se gradualmente no líquido que passa a membrana. O fluxo do líquido, em contracorrente com o fármaco, poderia alterar a difusão da molécula activa do compartimento doador para o receptor. No entanto, este efeito é insignificante: o fluxo de imiquimod através da membrana é dez vezes superior ao seu fluxo através dos sistemas de poloxâmero.

5. Exemplo: Teste de penetração de imiquimod

5.1. Composições e condições experimentais

5.1.1. Composições

As composições submetidas ao teste foram:

- 0,9% de Imiquimod - 15% de HP- β -CD em solução de ácido láctico 0,1 M
- 0,9% de Imiquimod em gel de Poloxâmero 407 a 19% contendo 15% de HP- β -CD (ácido láctico 0,1 M)
- 0,9% de Imiquimod em dispersão de lipossomas (1% de lecitina de soja em solução de ácido láctico 0,1 M)

5.1.2. Condições experimentais

Foi utilizada a bexiga de porcos fêmeas com 6-9 meses de idade: imediatamente após a excisão, a uretra foi cortada e o epitélio da bexiga (BE) foi seccionada para obter pedaços com cerca de 3 cm² de área. Cada porção de epitélio foi montada entre os compartimentos de uma célula de Franz com a superfície interna para cima. Como fase receptora (compartimento de baixo) foi utilizada solução de tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,4): esta foi mantida sob agitação (cerca de 300 rpm) a 37 °C durante a experiência. Uma das formulações descritas representa a fase doadora (compartimento de cima): a formulação (2 g) foi introduzida no compartimento doador depois de a temperatura do aparelho atingir 37 °C de temperatura. No final da experiência (4 horas após o início), o BE removido da célula de difusão foi exaustivamente lavado com água destilada para remover formulação em excesso e cuidadosamente limpo com um lenço de papel. Em seguida, o BE foi congelado e seccionado utilizando um micrótomo criostático. Foram introduzidas cinco secções de BE sucessivas (cada de 100 µm de espessura) num tubo, foram adicionados 5 mL de ácido láctico (92%) e mantidos sob agitação de um dia para o outro. A fase líquida foi filtrado (0,22 µm) e analisada por HPLC em relação ao imiquimod.

5.2. Resultados

A Figura 12 representa os resultados obtidos que indicam a quantidade de imiquimod recuperado no BE após 4 horas de contacto com a formulação (os dados são normalizados para a área de absorção). Os dados são a média de 3 experiências (solução e lipossomas) ou 6 experiências (formulação de gel).

A formulação de gel afecta a absorção de imiquimod no epitélio da bexiga: a quantidade de activo libertada do gel e recuperado no BE é inferior à libertada a partir da solução. É interessante notar que a quantidade de imiquimod formulado em lipossomas e presente no BE é maior do que aquela da solução: este resultado sugere um efeito de promoção das vesículas de lípido na absorção do fármaco.

6. Exemplo: Solubilidade, densidade e viscosidade de diferentes composições compreendendo imiquimod

6.1. Solubilidade

6.1.1. Composições

A solubilidade de imiquimod foi determinada em diferentes sistemas solventes:

- soluções de ácido láctico - 0,025, 0,05, 0,1 e 0,2 M
- solução de ácido láctico 0,1 M contendo 5 ou 15% de HP- β -CD
- solução de ácido láctico 0,1 M contendo 5, 16 e 20% de Poloxâmero 407
- solução de ácido láctico 0,1 M contendo 5 ou 15% de HP- β -CD e 16% de Poloxâmero 407
- soluções de ácido glicólico, ácido tartárico e ácido glutâmico 0,1 M
- DMSO
- N-metil-pirrolidona
- PEG 400

6.1.2. Condições experimentais

Foi adicionada uma quantidade que excede a solubilidade do fármaco (2 g) dos diferentes sistemas solventes (50 mL) e agitada durante 24 horas (400 rpm) a 25 °C. As dispersões foram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos e as fases líquidas recolhidas e conservadas à temperatura ambiente até serem analisadas. A concentração de imiquimod nestas soluções foi determinada espectrofotometricamente ($\lambda = 319$ nm) após diluição apropriada.

6.1.3. Resultados e discussão

Na Tabela 8 são indicados os resultados obtidos. Os valores são a média de 3 determinações. A solubilidade do imiquimod em solução de ácido maleico será determinada em poucos dias.

Formulação	% p/p de imiquimod	pH
LA 0,025 M	0,33	3,93
LA 0,05 M	0,58	3,81
LA 0,1 M	1,18	3,73
LA 0,2 M	2,20	3,52
5% de CD LA 01	1,23	3,90
15% de CD LA 01	1,37	4,03
5% de PF127 LA 01	1,19	3,92
16% de PF127 LA 01	1,10	3,99
20% de PF127 LA 01	1,04	4,16
5% de CD- 16% de PF127 LA 01	1,15	4,05
15% de CD-16% de PF127 LA 01	1,22	4,25

(continuação)

Formulação	% p/p de imiquimod	pH
Ácido glicólico 0,1 M	0,68	3,82
Ácido tartárico 0,1 M	0,01	2,48
Ácido glutâmico 0,072 M	0,54	3,95
DMSO	0,09	n.d.
N-Metil-pirrolidona	0,16	n.d.
PEG 400	0,03	n.d.

Tabela 8: Estudo de solubilidade de imiquimod em diferentes sistemas solventes

Os resultados obtidos indicam que:

- existe uma relação linear entre ácido láctico e imiquimod (Figura 13, topo): a solubilidade do fármaco aumenta para uma concentração crescente do ácido carboxílico
- a ciclodextrina aumenta a solubilidade do imiquimod: também neste caso, o incremento do fármaco dissolvido está linearmente relacionado com a quantidade de ciclodextrina utilizada (Figura 13, fundo).
- O Poloxâmero 407 tem um efeito negativo na solubilidade do fármaco: à medida que a percentagem de polímero aumenta, a concentração de imiquimod na solução diminui.
- Quando estão presentes Poloxâmero 407 e ciclodextrina na formulação, os efeitos opostos destes componentes são compensados e a solubilidade do imiquimod não foi substancialmente modificada em relação à da solução de ácido láctico 0,1 M.
- Na presença de ácidos carboxílicos como os ácidos glicólico, tartárico e glutâmico a solubilidade do

fármaco é menor do que com o ácido láctico (o ácido glutâmico foi utilizado a uma concentração correspondente à sua solubilidade, *i. e.* 10,6 g/L). A solubilidade de imiquimod observada na presença de ácido tartárico pode ser explicada considerando as diferenças estruturais deste ácido (dicarboxílico) em relação aos outros compostos ácidos (ácidos hidroxicarboxílico): o valor de solubilidade mais baixo sugere o envolvimento da função alcoólica na formação do produto de adição fármaco/ácido hidroxicarboxílico. Para o ácido glutâmico, o papel do grupo hidroxilo é desempenhado pelo grupo amino primário do aminoácido.

- A solubilidade de imiquimod em solvente hidrófilo, não aquoso é muito baixa.

6.2. Densidade

6.2.1. Composições

A avaliação da densidade foi realizada em 5 mL das seguintes composições:

- solução de ácido láctico 0,1 M contendo 16% de Poloxâmero 407
- solução de ácido láctico 0,1 M contendo 5 ou 15% de HP- β -CD e 16% de Poloxâmero 407
- solução de ácido láctico 0,1 M contendo 5 ou 15% de HP- β -CD, 16% de Poloxâmero 407 e 0,5% de imiquimod
- solução de ácido láctico 0,1 M contendo 5% de HP- β -CD e 0,5% de imiquimod

6.2.2. Condições experimentais

Foram feitas 5 medições e foram calculados os valores médios e desvios padrão

6.2.3. Resultados

Formulação	densidade \pm D.P. (g/mL)
16% de PF127 LA 01	1,0155 \pm 0,0032
5% de CD-16% de PF127 LA 01	1,0299 \pm 0,0039
15% de CD-16% de PF127 LA 01	1,0639 \pm 0,0040
5% de CD-16% de PF127 LA 01 - 0,5% de imiquimod	1,0359 \pm 0,0033
15% de CD-16% de PF127 LA 01 - 0,5% de imiquimod	1,0670 \pm 0,0023
5% de CD LA 01 - 0,5% de imiquimod	1,0158 \pm 0,0036

Tabela 9: Determinação da densidade

6.3. Viscosidade

6.3.1. Composições

A viscosidade foi determinada nas seguintes composições:

- gel contendo 16% de Poloxâmero 407
- gel contendo 16% de Poloxâmero 407 e 15% de HP- β -CD
- gel contendo 16% de Poloxâmero 407 e 5% de HP- β -CD
- solução de 0,5% de imiquimod em ácido láctico (0,1 M) contendo 15% HP- β -CD

- solução de 0,5% de imiquimod em ácido láctico (0,1 M) contendo 5% HP- β -CD
- formulação de gel de imiquimod a 0,5% contendo 16% de Poloxâmero 407 e 15% de HP- β -CD
- formulação de gel de imiquimod a 0,5% contendo 16% de Poloxâmero 407 e 5% de HP- β -CD

6.3.2. Resultados

Na Tabela 10 são indicadas as viscosidade dos outros sistemas. Os valores são a média de 3 medições \pm D.P.

formulação	Viscosidade a 20 RPM (cP) \pm D.P.		
	10 °C ¹	25 °C ¹	37 °C ²
16% de PF127LA01	22,47 \pm 0,45	63,03 \pm 1,93	1103,00 \pm 82,31
5% de CD-16% de PF127 LA 01	31,90 \pm 0,35	65,80 \pm 1,08	571,77 \pm 94,73
15% de CD-16% de PF127 LA 01	64,27 \pm 1,33	76,43 \pm 0,47	573,33 \pm 50,14
5% de CD-16% de PF127 LA 01 - 0,5% de imiquimod	32,27 \pm 0,40	68,20 \pm 1,82	963,05 \pm 3,32
15% de CD-16% de PF127 LA 01 - 0,5% de imiquimod	70,33 \pm 0,51	93,47 \pm 2,64	795,13 \pm 110,56

¹Fuso SC18

²Fuso SC29

Tabela 10: viscosidade do gel (20 RPM) a 10, 25 e 37 °C

Para as formulações estudadas foi observado um comportamento significativamente diferente a temperaturas diferentes: a 10 e 25 °C, a adição de ciclodextrina e/ou imiquimod à solução polimérica leva a um aumento da viscosidade, enquanto a 37 °C, a viscosidade é reduzida pela ciclodextrina e aumentada pelo fármaco.

7. Exemplo: Solubilidade de imiquimod em soluções de sal e em Solução de Urina Artificial

7.1. Composições

A solubilidade do imiquimod contido nas formulações de gel foi avaliada em várias soluções de sais. O estudo foi realizado em formulações de imiquimod constituídas por:

Gel de imiquimod a 0,9%

Poloxâmero 407	mg	160,162
HP β CD	mg	50,025
Imiquimod	mg	9,005
Ácido láctico (90,3%)	mg	10,017
Água para injeção	q.b. mg	1000,000

Gel de imiquimod a 0,5%

Poloxâmero 407	mg	160,157
HP β CD	mg	50,031
Imiquimod	mg	5,002
Ácido láctico (90,3%)	mg	10,024
Água para injeção	q.b. mg	1000,000

Gel de imiquimod a 0,1%

Poloxâmero 407	mg	160,098
HP β CD	mg	50,013
Imiquimod	mg	1,007
Ácido láctico (90,3%)	mg	10,028
Água para injeção	q.b. mg	1000,000

Como solventes para o fármaco foram utilizadas as seguintes soluções:

- Água
- Sulfato de Na 10 mM
- Fosfato de K 14 mM
- Bicarbonato de Na 25 mM
- AUS

O pH foi corrigido a $6,50 \pm 0,05$ com 1 HCl

A Solução de Urina Artificial (AUS) tinha a seguinte composição:

Bicarbonato de Na	25 mM
Ureia	170 mM
Ácido úrico	0,4 mM
Creatinina	7 mM
Cloreto de Na	90 mM
Sulfato de Na	10 mM
Hidrogenofosfato de K ₂	7 mM
Di-hidrogenofosfato de K	7 mM
Cloreto de NH ₄	25 mM

O pH foi corrigido a $6,50 \pm 0,05$ com HCl 1 M]

7.2. Condições experimentais

Volumes predeterminados de formulação e solvente foram transferidos para um balão de 10 mL para obter misturas onde as proporções de volume de solvente/formulação foram 0,5, 1, 5 e 10. Estes sistemas foram mantidos sob agitação durante intervalos de tempo diferentes (25, 50, 240 e 240 minutos para os sistemas de proporção de volume solvente/formulação de 0,5, 1, 5 e 10, respectivamente). Os tempos seleccionados correspondem aos tempos prováveis de formação de urina (taxa de produção de urina = 1 mL/min) (para o sistema de proporção de volume solvente/formulação de 10, o intervalo de tempo aplicado de 240 minutos é inferior ao esperado porque o tempo calculado (500 minutos) excede o tempo eficaz de contacto da formulação com a bexiga). Depois disto, foi medido o pH de cada sistema. Os sistemas foram centrifugados a 5000 rpm durante 15 minutos e as fracções líquidas recuperadas submetidas a análise espectrofotométrica ($A = 319 \text{ nm}$) em relação ao teor de imiquimod.

7.3. Resultados e discussão

Os resultados (médias de 3 réplicas) são indicados como porções de pH e como percentagens de imiquimod precipitado nos Tabelas 11 e 12 seguintes.

Tabela 11: Medições de pH

Proporção de solução/formulação		H ₂ O	SO ₄ ²⁻	H ₂ KO ₄ P/ HK ₂ O ₄ P	HCO ³⁻	A.U.S.	gel a 0,9%
gel de Imiquimod a 0,9%	solução						
0			6,53	6,50	6,52	6,51	3,40
1	0,5	3,34	3,30	3,38	3,48	3,56	
1	1	3,25	3,31	3,36	3,50	3,80	
1	5	4,50	3,28	3,57	4,49	5,73	
1	10	3,30	3,30	3,89	6,10	6,33	

Proporção de solução/formulação		H ₂ O	SO ₄ ²⁻	H ₂ KO ₄ P/ HK ₂ O ₄ P	HCO ³⁻	A.U.S.	gel a 0,5%
gel de imiquimod a 0,5%	solução						
0			6,53	6,50	6,52	6,51	3,21
1	0,5	3,28	3,30	3,33	3,49	3,72	
1	1	3,36	3,35	3,42	3,66	4,06	
1	5	3,26	3,30	3,68	5,10	6,41	
1	10	3,33	3,35	4,08	6,55	6,60	

Proporção de solução/formulação		H ₂ O	SO ₄ ²⁻	H ₂ KO ₄ P/ HK ₂ O ₄ P	HCO ³⁻	A.U.S.	gel a 0,1%
gel de imiquimod a 0,1%	solução						
0			6,53	6,50	6,52	6,51	3,21
1	0,5	2,88	2,85	2,91	3,06	3,31	
1	1	2,80	2,81	2,95	3,25	3,62	
1	5	2,90	2,94	3,34	4,88	6,14	
1	10	3,02	3,09	3,78	8,29	6,53	

Tabela 12: Precipitação de Imiquimod

Imiquimod precipitado (% p/p)					
Solução de Sulfato					
Proporção de solução/formulação (v/v)	0,5	1	5	10	
% Inicial de Imiquimod	0,9	22,46	47,56	83,54	75,84
	0,5	43,17	69,28	71,54	68,56
	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00

Imiquimod precipitado (% p/p)					
Solução de Bicarbonato					
Proporção de solução/formulação (v/v)	0,5	1	5	10	
% Inicial de Imiquimod	0,9	0,00	0,00	43,22	99,76
	0,5	0,00	0,00	74,82	99,77
	0,1	0,00	1,86	0,00	98,84

Imiquimod precipitado (% p/p)					
Solução de tampão de fosfato					
Proporção de solução/formulação (v/v)	0,5	1	5	10	
% Inicial de Imiquimod	0,9	0,00	0,00	0,33	4,29
	0,5	2,21	0,00	1,30	2,19
	0,1	0,00	0,26	0,00	1,29

Imiquimod precipitado (% p/p)					
Água					
Proporção de solução/formulação (v/v)	0,5	1	5	10	
% Inicial de Imiquimod	0,9	30,36	0,00	2,60	3,06

(continuação)

Imiquimod precipitado (% p/p)					
	0,5	0,39	0,00	0,74	2,74
	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00

Imiquimod precipitado (% p/p)					
Solução de Urina Artificial					
Proporção de solução/formulação (v/v)	0,5	1	5	10	
% Inicial de Imiquimod	0,9	23,23	44,02	96,60	98,92
	0,5	38,89	57,75	97,93	98,63
	0,1	0,00	0,00	84,29	86,35

O pH das diferentes soluções (excepto AUS) foi corrigido para cerca de 6,5. Notou-se que

- um volume pequeno de solução (independentemente do tipo de sal) não é capaz de controlar o pH da mistura.
- A.U.S. e solução de bicarbonato em proporção de volume elevada com a formulação exibiu um pH que não era significativamente diferente do seu valor inicial.
- a quantidade de fármaco presente na formulação não alterou substancialmente a aptidão de tamponamento da A.U.S e Solução de Bicarbonato: foi observada uma ligeira diminuição de pH à medida que a percentagem de imiquimod na formulação diminuía (aumento do ácido láctico livre).

A diluição com água não determina uma precipitação significativa do fármaco, independentemente da proporção gel/solução: uma excepção é representada pelo sistema água/gel

de imiquimod a 0,9% (proporção em volume de 0,5:1) para o qual foi observada uma diminuição coerente um da concentração de fármaco solubilizado (mais do que 30%).

Com a solução de tampão de fosfato a precipitação de fármaco não era macroscopicamente evidente: máx de 4,29% de diminuição de fármaco em solução para a formulação contendo a quantidade mais elevada de imiquimod (0,9%) e à máxima proporção de diluição.

Entre os aniões, o bicarbonato determinou a maior precipitação de fármaco: a uma proporção de volume de 10:1 foi observada uma precipitação quase completa de imiquimod para todas as formulações.

A solução de sulfato separou o fármaco dos geles de 0,9% e 0,5%, mas não do sistema de fármaco a 0,1%: para o gel contendo o teor de fármaco mais elevado, estava presente uma relação parabólica entre a percentagem de imiquimod precipitado e a proporção de diluição.

Os resultados obtidos com Solução de Urina Artificial podem ser atribuídos principalmente à presença de iões de bicarbonato e sulfato, enquanto não pode ser excluído um efeito aditivo/sinérgico do outro componente da AUS.

8. Exemplo: Comparação de formulações de imiquimod contendo percentagens diferentes de poloxâmero

8.1. Composições

O trabalho experimental teve como objectivo comparar algumas características físico-químicas de formulações de imiquimod que contêm quantidades diferentes e poloxâmero 407 e de fármaco.

Os sistemas investigados tinham as seguintes composições:

Formulação 0,5% - 16

Poloxâmero 407		160,06 mg
Imiquimod		5,02 mg
HP β CD		50,06 mg
Ácido láctico (90,3%)		10,00 mg
Água para injeção	q.b.	1000,00 mg

Formulação 0,1% - 16

Poloxâmero 407		160,05 mg
Imiquimod		1,01 mg
HP β CD		50,02 mg
Ácido láctico (90,3%)		10,00 mg
Água para injeção	q.b.	1000,00 mg

Formulação 0,5% - 10

Poloxâmero 407		160,03 mg
Imiquimod		5,01 mg
HP β CD		50,06 mg
Ácido láctico (90,3%)		10,00 mg

(continuação)

Formulação 0,5% - 16

Água para injeção q.b. 1000,00 mg

Formulação 0,1% - 10

Poloxâmero 407 100,06 mg

Imiquimod 1,04 mg

HP β CD 50,01 mg

Ácido láctico (90,3%) 10,00 mg

Água para injeção q.b. 1000,00 mg

8.2. Resultados

A viscosidade e o pH destas formulações foram determinados a 25 e 37 °C e os resultados são indicados na Tabela 13 seguinte:

Formulação	Viscosidade a 25 °C (*)–			Viscosidade a 37 °C (**)–			pH
	Velocidade de rotação (rpm)	Força de torção (%)	Viscosidade (cP)	Velocidade de rotação (rpm)	Força de torção (%)	Viscosidade (cP)	
F. 0,5% - 16	20	47,8	2221	8	72,1	270,7	3,26
F. 0,1% - 16	20	50,3	2350	15	83,1	166,2	2,99
F. 0,5% - 10	35	12,5	334,8	35	11,9	10,2	3,23
F. 0,1% - 10	35	12,7	340,0	35	11,5	9,86	2,60

(*) Fuso nº 25

(**) Fuso nº 18

9. Exemplo: Avaliação In Vitro da toxicidade da formulação de imiquimod no epitélio da bexiga urinária de porco

9.1. Material e Métodos

9.1.1. Concepção do estudo

O estudo foi realizado sobre o epitélio da bexiga de dois porcos utilizando os seguintes tratamentos:

- formulação de imiquimod a 0,1% (uma mistura de 16% de Poloxâmero, 5% de Hidroxipropil Beta ciclodextrina, em ácido láctico 0,1 M)
- Veículo (uma mistura de 16% de Poloxâmero, 5% de Hidroxipropil Beta ciclodextrina, em ácido láctico 0,1 M)
- solução de NaCl a 0,9%

Porções de bexiga de porco foram colocadas entre as câmaras doadora (tratamento) e receptora de células de Franz. Foi utilizado o meio receptor de PBS (pH 7,4) em todas as experiências. Uma hora depois do início da experiência, o meio receptor foi retirado e analisado quanto ao teor de imiquimod. A bexiga foi recuperada; a porção tratada foi separada e dividida em duas partes: uma foi fixa em formalina, embutida, seccionada e corada (H&E) para exame histológico; e a outra parte foi submetida a extracção e análise de fármaco.

9.1.2. Revisão por pares

O exame histopatológico foi realizado em cinco secções da bexiga urinária *i. e.* 2 lâminas de porco 1 (marcado imiquimod 1 e veículo 1), 2 lâminas de porco 2 (marcado imiquimod 2 e veículo 2) e uma lâmina com a solução de NaCl (marcado controlo).

As lâminas foram examinadas principalmente em relação à integridade urotelial e para quaisquer alterações da submucosa incluindo inflamação.

9.2. Resultados e conclusão

O tecido do urotélio e da submucosa pareceu ser normal em todas as lâminas examinadas. Não existiram diferenças significativas entre tratamentos (Dados não apresentados).

9.3. Experiências de penetração de Imiquimod para avaliação da toxicidade

9.3.1. Objectivo

A fim de avaliar a penetração da molécula activa no epitélio vesical do porco foi realizada uma série de experiências de penetração *in vitro*.

As formulações de imiquimod investigadas foram:

- Imiquimod a 0,5% em solução de ácido láctico 0,1 M
- Imiquimod a 0,5% - 5% de HP- β -CD em solução de ácido láctico 0,1 M
- Gel de Imiquimod a 0,5% em 16% de poloxâmero 407
- Gel de Imiquimod a 0,5% - 5% de HP- β -CD em 16% de poloxâmero 407

A composição dos sistemas foi a seguinte:

Imiquimod a 0,5% em solução de ácido láctico 0,1 M

Imiquimod		5,020 mg
Ácido láctico (90,3%)		10,020 mg
Água para injeção	q.b.	1000,00 mg

Imiquimod a 0,5% - 5% HP- β -CD em solução de ácido láctico 0,1 M

HP- β -CD		50,080 mg
Imiquimod		5,020 mg
Ácido láctico (90,3%)		10,080 mg
Água para injeção	q.b.	1000,000 mg

Gel de Imiquimod a 0,5% em 16% de poloxâmero 407

Poloxâmero 407		160,020 mg
Imiquimod		5,000 mg
Ácido láctico (90,3%)		10,100 mg
Água para injeção	q.b.	1000,000 mg

Gel de Imiquimod a 0,5% - 5% de HP- β -CD em 16% de poloxâmero 407

Poloxâmero 407		160,162 mg
HP- β -CD		50,025 mg

(continuação)

Imiquimod	5,005 mg
Ácido láctico (90,3%)	10,017 mg
Água para injeção	q.b. 1000,000 mg

9.3.2. Método

A bexiga, de um porco fêmea com 6-9 meses de idade, foi seccionada e montada entre os compartimentos de uma célula de Franz com a superfície interna para cima. Em todas as experiências foi utilizada solução de tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,4) como fase receptora: foi mantida sob agitação (cerca de 300 rpm) a 37 °C durante a experiência. Uma formulação contendo imiquimod (2 g) representou a fase doadora.

No final da experiência (4 horas após o início), o epitélio da bexiga (BE) retirado da célula de difusão foi exaustivamente lavado com água destilada para remover a formulação em excesso e cuidadosamente limpo com um lenço de papel. Em seguida, o BE foi congelado e seccionado utilizando um micrótomo criostático. Foram introduzidas cinco seções de BE sucessivas (cada de 100 µm de espessura) num tubo, foram adicionados 5 mL de ácido láctico (92%) e mantidos sob agitação de um dia para o outro. A fase líquida foi filtrada (0,22 µm) e analisada por HPLC em relação ao imiquimod.

9.3.3. Resultados

A Figura 15 representa os resultados obtidos relativamente à quantidade de imiquimod recuperado no BE após 4 horas de contacto com a formulação (os dados são normalizados em relação à área de absorção). Os dados são a média de 3 experiências.

10. Exemplo: Farmacocinética e toxicidade de imiquimod intravesical: um estudo pré-clínico em porcos

10.1. Introdução

A fim de testar se o cancro da bexiga pode ser um alvo adequado para a terapia com imidazoquinolina(aminas) foi estudada a expressão de TLR-7 em tecidos de cancro da bexiga e bexiga normal humana. As amostras de tecido de porco foram estudadas para validação do modelo. Depois disso, para testar o potencial e os riscos das imidazoquinolina(aminas) quando utilizadas por via intravesical foi realizado um estudo animal, no qual foram testadas três formulações intravesicais diferentes de imiquimod e um controlo de veículo. Foram estudados o bem-estar do animal, as propriedades farmacocinéticas, a produção citocinas e a histologia da parede da bexiga.

10.2. Animais, Material e Métodos

10.2.1. Detecção da expressão de TLR-7

Quinze espécimes de cancro da bexiga humano e seis espécimes de bexiga normal, fixos em formalina, embutidos em

parafina foram corados em relação ao TLR-7 por Mosaic Laboratories, LLC (Lake Forest, CA, EUA). Além disso, 28 espécimes diferentes de tecido humano normal (que não da bexiga) foram corados quanto à expressão de TLR-7. Além disso, foram testadas amostras de tecido da bexiga, amígdala, coração, fígado, baço e rim de suíno.

A intensidade de coloração de cada espécime foi avaliada relativamente à intensidade de uma lâmina de controlo contendo uma secção adjacente corada com um anticorpo irrelevante para a espécie e de isotipo condizente. A coloração da secção marcada com o controlo de reagente negativo foi considerada "base." As secções foram classificadas como se segue: 0 nenhuma coloração relativamente à base, 1 + coloração fraca, 2+ coloração moderada e 3+ coloração forte. A coloração positiva total (a soma de todas as revelações em 1+, 2+ e 3+ foi registada para cada espécime. A classificação H foi calculada com base na soma do produto da percentagem de células coradas a cada intensidade utilizando o seguinte equação: $(3 \times \% \text{ de coloração de células a } 3+) + (2 \times \% \text{ de coloração de células a } 2+) + (1 \times \% \text{ de coloração de células a } 1+)$. Os valores da classificação H variaram desde 0-300.

10.2.2. Modelo de porco

Os procedimentos animais foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Países Baixos) e em conformidade com as regulações nacionais e Europeias. Para este estudo foram utilizados porcos fêmeas

(Dutch Landrace). O aparelho urogenital do porco assemelha-se muito ao sistema urogenital humano e a forma do pênis e o divertículo do prepúcio impedem a cateterização transuretral de um porco macho. As porcas foram alojadas em baterias de gaiolas especiais para suínos em aço inoxidável e alimentadas com alimento universal de suíno. Os porcos foram divididos em quatro grupos de seis animais. Os procedimentos experimentais foram realizadas sob anestesia geral. A pré-medicação continha uma mistura de 10 mg/kg de cetamina e 0,5 a 1,0 mg/kg de midazolam i.m. numa dose. A manutenção da sedação foi feita pela mesma mistura a metade da dosagem a cada 45 minutos. A bexiga foi esvaziada sem traumatismo de sucção antes do início do tratamento (via 12 cateteres French Foley) e foram instilados 50 mL do fármaco de estudo por via intravesical. Os animais receberam uma solução de imiquimod a 0,5% dissolvido em ácido láctico 0,1 M (grupo 1); uma solução de imiquimod a 0,5% dissolvido em ácido láctico 0,1 M, poloxâmero 407 a 16% como emulsionante e HP β CD (hidroxipropil- β -ciclodextrina) a 15% como agente estabilizante (grupo 2); uma solução de imiquimod a 0,5% dissolvido em ácido láctico 0,1 M, poloxâmero 407 a 16% e HP β CD a 5% (grupo 3) ou um controlo de veículo (ácido láctico 0,1 M) (grupo 4). O cateter foi fixo e o fluido de instilação foi retido na bexiga durante 60 minutos, após o que a bexiga foi esvaziada. A bexiga não foi lavada após esvaziamento.

Foram obtidas amostras de sangue para as análises farmacocinética (PK), medições de citocina (IL-6), medições de creatinina e contagem total de células sanguíneas. A veia cefálica ou veia jugular interna, externa ou comunal foi puncionada, dependendo do ângulo de punção e profundidade de penetração da agulha.

As amostras para contagem do sangue e medição da creatinina foram recolhidas em tubos de 3 mL de EDTA de potássio e tubos de 3 mL de heparina de lítio com divisor de gel, respectivamente, antes da instilação e 60 minutos, 24 horas e 1 semana (imediatamente antes cistectomia) após o início da instilação. As amostras foram conservadas sobre gelo e transferidas para o laboratório para análise.

As amostras de sangue para análise farmacocinética e medição de citocinas foram recolhidos em tubos de 4 mL de heparina de lítio com divisor de gel, antes da instilação do fármaco de estudo e 15, 30, 60, 120, 240 e 480 minutos após o início da instilação de fármaco e também imediatamente antes da cistectomia. As amostras foram transferidas em gelo para o laboratório para processamento do plasma dentro de 30 minutos. O sangue foi centrifugado durante 15 minutos a 3200 rpm a 4 °C, o plasma foi recolhido para análise de PK e citocinas, conservado a -80 °C e introduzido em gelo seco para análise.

O pós-tratamento descarregou o conteúdo da bexiga e a urina descarregada imediatamente antes da necropsia foi recolhida para análise da concentração de imiquimod. A urina foi imediatamente congelada e conservada em tubos de plástico a -80 °C, e introduzida em gelo seco para determinação de imiquimod. Foi realizado o exame de urina com vareta na urina descarregada pré- e pós-tratamento e na urina recolhida imediatamente antes da autópsia. As concentrações de imiquimod no plasma e urina foram determinadas por CHIMAN s.r.l. (Rottofreno, Itália) por cromatografia líquida-espectroscopia de massa/espectroscopia de massa (LC-MSMS). As amostras de plasma para medição de IL-6 foram analisadas por Areta International s.r.l. (Gerenzano,

Itália) utilizando o kit "Quantikine Porcine IL-6" (P6000; System R&D).

A temperatura corporal foi medida por via rectal antes e 1, 8 e 24 horas e um semana após o início do tratamento. O bem-estar dos animais foi monitorizado por pessoal experiente utilizando uma lista protocolar seleccionada de possíveis sinais e sintomas de toxicidade antes da experiência, imediatamente depois da instilação e imediatamente antes da cistectomia.

Foram sacrificados e cistectomizados três animais por grupo 24 horas após tratamento e 7 dias após tratamento os restantes animais sofreram o mesmo procedimento. O material das bexigas foi recolhido e processado para histologia como se segue: Foram retiradas biopsias da bexiga de 1 cm² do domo, trígono, parede lateral direita e parede lateral esquerda e transferidas para 10% de formalina em PBS. O material foi embutido em parafina, seccionado e corado com H&E. As lâminas foram avaliadas quanto aos sinais de inflamação e reacção alérgica na submucosa e mucosa. As anormalidades microscópicas foram classificadas como nenhuma reacção, ou reacção ligeira, moderada ou grave.

10.3. Resultados

10.3.1. Expressão de TLR-7

A expressão de TLR-7 dos 15 espécimes de cancro da bexiga humano exibiram coloração positiva em todas as amostras variando desde 70% a 100% com uma média de 90% (DP=9%). A coloração mais intensa foi da membrana nuclear/perinuclear e a coloração citoplasmática mais fraca (Figura 16). A classificação H variou

desde 90 a 155 com uma média de 127 (DP=23). Foi também observada coloração positiva em 6 espécimes de epitélio de bexigas normais variando desde 80% a 100% com uma média de 95% (DP=8%). A classificação H variou desde 100 a 230 com uma média de 179 (80=55). Foi observada expressão de TLR-7 em quase todos os tecidos diferentes da bexiga examinados (dados não apresentados), muito proeminentemente em tecido linfóide. Foi observada ausência de coloração no coração e músculo liso. A expressão de TLR-7 em tecidos suínos (Figura 17) foi semelhante aos tecidos humanos correspondentes.

10.3.2. Experiência de porco

Vinte e quatro porcos com um peso médio de 57,1 kg (gama, 40,0-85,0 kg) foram divididos em quatro grupos de seis porcos tratados com várias formulações de imiquimod como uma única instilação intravesical de 50 minutos. Ao longo do período de uma semana de seguimento após instilação (3 porcos por grupo) não foi observada qualquer deterioração do bem-estar animal. Foram observados sinais menores de toxicidade, possivelmente devido ao fármaco de estudo, em quatro porcos (*i. e.*, baixa ingestão de alimentos em três porcos, grupo 1, 2 e 4 e fezes moles num porco, grupo 1). Não houve quaisquer outros sinais de bem-estar animal comprometido.

A temperatura corporal pós-tratamento não foi influenciada pela instilação do fármaco de estudo e foi comparável à temperatura corporal pré-tratamento para todos os grupos de tratamento. Embora tinha sido observado um ligeiro aumento nos níveis de creatinina uma semana após instilação no grupo 1 e 2,

o que possivelmente indica deficiência renal, não foi notada qualquer correlação óbvia com as modalidades de tratamento.

Os valores de hematologia estavam dentro da gama normal com excepção de um porco no grupo 1 que mostrou valores hematológicos anormais (concentração de hemoglobina 2,5 mmol/L, hematócrito 12%, contagem de trombócitos $18 \times 10^9/L$, contagem de leucócitos $8,8 \times 10^9/L$ no final do período de instilação de 50 minutos). No entanto, a T=24 h quase todos os valores hematológicos deste animal estavam dentro da gama normal, excepto para a contagem de trombócitos ($53 \times 10^9/L$), a qual estava dentro da gama normal uma semana após instilação.

O exame da urina pós-tratamento (50 minutos após o início da instilação) mostrou quantidades elevadas de imiquimod (Tabela 14) para todos os grupos de tratamento, excepto para o grupo de controlo de veículo. A quantidade de imiquimod recolhida na urina dos animais no grupo 1 foi quase 2 vezes superior à dos animais no grupo 2 e 3, sem qualquer diferença importante entre os grupos 2 e 3. Após 24 horas, os níveis de imiquimod eram muito baixos ($<5 \mu g/mL$).

Tabela 14 Quantidade de Imiquimod administrada e medida no final do tratamento, por grupo de tratamento

Grupo	Quantidade total de Imiquimod administrada (μg)	Quantidade total de Imiquimod no final do tratamento (μg , gama, %)
1	268950	218860 (23440-320400) (81,4)
2	257500	132735 (64350-176040) (51,5)
3	247850	121636 (46260-219075) (49,1)

As análises farmacocinéticas revelaram apenas pouca absorção sistêmica (Tabela 15 e figura 18). Os níveis máximos no plasma dos animais no grupo 1 foram três vezes superiores aos níveis máximos no plasma dos animais do grupo 2 e 3, resultando numa AUC dupla. Após oito horas já não podia ser detectado quase nenhum imiquimod ($<2,10$ ng/mL) em qualquer plasma de porco.

Tabela 15 Parâmetros farmacocinéticos de Imiquimod no plasma, por grupo de tratamento (média \pm dp)

Grupo	C _{max} (ng/mL)	AUC (ng*h/mL)	T _{1/2} (h)
1	45,17 \pm 29,96	96,75 \pm 50,42	1,18 \pm 0,12
2	16,23 \pm 10,22	45,67 \pm 26,53	1,58 \pm 1,05
3	17,00 \pm 6,57	56,65 \pm 24,94	1,90 \pm 1,06

C_{max} = Concentração máxima; AUC = Área sob a Curva; T_{1/2} = semivida

Os níveis da citocina IL-6 foram semelhantes em todos os grupos, incluindo o grupo de controlo de veículo, com os níveis máximos de IL-6 atingidos oito horas após instilação dos fármacos de estudo (dados não apresentados).

O exame macroscópico das bexigas ressectadas não mostrou quaisquer anormalidades, excepto algumas áreas com um aspecto hemorrágico nos porcos sacrificados 24 horas após instilação de imiquimod (grupo 1-3), o qual foi menos evidente ou estava ausente nos porcos sacrificados após sete dias.

O exame microscópico das bexigas ressectadas não revelaram qualquer diferença entre as quatro regiões amostradas (parede lateral esquerda, parede lateral direita, domo, trígono). Na maioria dos animais dos três grupos de tratamento foi observada

uma reacção inflamatória submucosal moderada, predominantemente linfocítica, 24 horas após a instilação intravesical (figura 20), a qual diminuiu para inflamação ligeira nos porcos sacrificados após sete dias. Vinte e quatro horas após instilação foi observada vasculite em três porcos, igualmente divididos pelos três braços de tratamento (figura 21). Foi observada miosite moderada num porco do grupo 1. Foi observado epitélio da bexiga atípico ligeiramente reactivo em quase todos os animais sacrificados após 24 horas, o qual desapareceu com o tempo e já não era visível nos animais sacrificados após uma semana. A erosão, edema da submucosa e sangramento foram ligeiros, não foi observada qualquer reacção alérgica.

10.4. Discussão

Como já especificado na descrição, o imiquimod, um membro líder da família de imidazoquinolin(aminas), mostrou eficácia contra muitos tipos de tumores (Schön MP, Schön M. Imiquimod: mode of action. Br J Dermatol2007;157:8-13). O composto liga-se a TLR-7, induzindo a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, as quais induzem consecutivamente uma resposta imunológica mediada por células específica de tumor profunda, a qual é muito semelhante ao mecanismo de funcionamento proposto para a BCG. Além disso, o imiquimod pode exercer efeitos apoptóticos directos em células tumorais, pode estimular a expressão de genes independente de TLR e pode interferir com as vias de sinalização do receptor de adenosina (Schön MP, Schön M. Imiquimod: mode of action. Br J Dermatol2007;157:8-13).

O imiquimod é eficaz e bem tolerado como um agente tópico para o tratamento de várias lesões dermatológicas benignas e malignas. As reacções cutâneas locais são os efeitos secundários mais comuns (Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: Results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol* 2004;50:722-33). O imiquimod foi também estudado como modalidade de tratamento sistémico: a administração semanal de dose oral elevada de imiquimod foi estudada num ensaios de fase I em doentes com cancro (Witt PL, Ritch PS, Reding D, McAuliffe TL, Westrick L, Grossberg SE, Borden EC. Phase I trial of an oral immunomodulator and interferon inducer in cancer patients. *Cancer Res* 1993;53:5176-5180). Os efeitos secundários limitantes da dose foram sintomas semelhantes a gripe e linfocitopenia ligeira.

O cancro da bexiga pode ser um alvo interessante para tratamento com imiquimod: A administração intravesical de imiquimod assemelha-se ao tratamento tópico de lesões cutâneas com contacto directo com as células malignas e citotoxicidade directa ou apoptose induzida por imiquimod independente de uma resposta imunológica. Além do mais, a instilação intravesical evita as perdas do metabolismo de primeira passagem e permite que o efeito terapêutico de um fármaco se localize no sítio desejável com efeitos secundários sistémicos mínimos.

A evidência experimental de que as imidazoquinolina(aminas) podem ser, de facto, apropriadas a modalidades de tratamento para o cancro da bexiga foi proporcionado por Smith *et al.* Estes investigadores mostraram que o TLR-7 é expresso em linhas celulares de cancro da bexiga de murino e humano e que a

imidazoquinolina tem efeitos biológicos directos nestas linhas celulares: a viabilidade celular foi diminuída e foi induzida apoptose e produção de citocinas. Além disso, os resultados iniciais num modelo em ratinho ortotópico imunocompetente sugeriram efeitos antitumorais *in vivo* (Smith EB, Schwartz M, Kawamoto H, *et al.* Antitumour effects of Imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2007;177:2347; Liu H, Schwartz MJ, Hwang DH, Scherr OS. Tumour growth inhibition by an imidazoquinoline is associated with c-Myc down-regulation in urothelial cell carcinoma. *BJU Int* 2008; 101:894-901)

Para investigar se o alvo de imiquimod, TLR-7, é expresso no cancro da bexiga humano foi avaliada a expressão de TLR-7 em 15 espécimes. Foi demonstrada coloração positiva em todas as amostras com uma média de 90%, contudo houve alguma heterogeneidade na intensidade que conduziu a classificações H que variaram desde 90 a 165. Estes resultados demonstram que o cancro da bexiga pode ser um alvo atractivo para a terapia com imiquimod.

Para avaliar a farmacocinética e possível toxicidade das instilações de imiquimod foram realizadas experiências em porcos. A expressão de TLR-7 em amostras de tecido de bexiga de suíno e humano foi semelhante, corroborando a validade do modelo de porco. Foram estudadas três soluções intravesicais de imiquimod diferentes e um controlo de veículo (solução de ácido láctico). Nenhuma das formulações testadas afectou o bem-estar geral do porco como avaliado *e. g.*, pelo aspecto da mucosa, comportamento, ingestão de alimentos/água, etc. A análise do plasma mostrou apenas absorção sistémica pequena de imiquimod após instilação da bexiga, independentemente da formulação

utilizada. Em conformidade, foram recuperadas quantidades elevadas de imiquimod na urina após instilação. No entanto, os níveis de imiquimod na urina após tratamento em animais tratados com imiquimod numa única solução de ácido láctico (grupo 1) foram quase 2 vezes mais altos do que em animais tratados com formulações de imiquimod com poloxâmero e HP β CD (grupo 2 e 3). Além do mais, o nível máximo médio de imiquimod no plasma no grupo 1 foi 3 vezes mais alto do que nos animais do grupo 2 e 3. Esta diferença é provavelmente o resultado da bioadesividade aumentada e prolongada das formulações de fármaco com poloxâmero e HP β CD na parede da bexiga. No entanto, este efeito foi de curta duração, uma vez que após oito horas já não podia ser detectado quase nenhum imiquimod no plasma do porco e após 24 horas já não podia ser detectado quase nenhum imiquimod na urina em quaisquer dos animais, independentemente da formulação de imiquimod. É possível que as formulações de fármaco 2 e 3 conduzam a níveis sustentados, mais longos de imiquimod na membrana.

Os níveis de IL-6 no plasma foram semelhantes em todos os grupos, incluindo o grupo de controlo de veículo, com os valores máximos a serem atingidos oito horas após as instilações da bexiga, muito provavelmente devido à reacção de stress após anestesia geral e cateterização da bexiga, e não à imunoestimulação pelo imiquimod. Além do mais, os níveis de imiquimod no plasma foram demasiado baixos para conseguir uma resposta sistémica de citocinas.

O exame histopatológico da parede da bexiga revelou a reacção inflamatória pretendida nos grupos tratados com imiquimod. Além desta reacção inflamatória pretendida não foram observadas anormalidades significativas. Apenas a vasculite pode

representar alguma reacção tóxica, embora transitória: não foi observada qualquer vasculite nos animais sacrificados no dia 7. Não é possível realizar comparações intergrupo significativas com estes números pequenos por grupo, contudo, não foi observada qualquer diferença importante entre as soluções de imiquimod testadas.

Em conclusão, o imiquimod administrado por via intravesical nos porcos é bem tolerados, não provoca qualquer toxicidade na parede da bexiga e as formulações com poloxâmero e HP β CD permanecem mais tempo na bexiga com menos absorção sistémica. O perfil de segurança do imiquimod intravesical compara favoravelmente com as das terapias actuais tal como a BCG. Considerando as características farmacocinéticas muito semelhantes será iniciado um estudo de lesão marcadora de incremento de dose de fase I com imiquimod a 0,5% em ácido láctico 0,1 M, poloxâmero 407 a 16% e HP β CD a 5% em doentes com NMIBC.

11. Exemplo: Optimização da formulação intravesical de um agonista do receptor de tipo Toll 7 para a terapia de cancro da bexiga

11.1. Introdução

O objectivo deste estudo foi optimizar a formulação de imiquimod para melhorar a aplicação terapêutica. Foi comparada a inflamação sistémica e local induzida por várias formulações de imiquimod. A eficácia anticancerígena de imiquimod em polímero de poloxâmero termossensível foi avaliado em modelos de cancro da bexiga ortotópicos em de murino.

11.2. Material e Métodos

11.2.1. Ratinhos

Ratinhos C57BL/6 fêmeas com 6 a 8 semanas de idade foram adquiridos de Charles River Laboratory (Wilmington, MA). Os ratinhos com deficiência de TLR7 foram uma doação de S. Akira (Osaka University, Osaka, Japão) e cruzados durante 10 gerações com os ratinhos C57BL/6 de base. Todos os ratinhos foram alojados em condições correntes na Instalação da Animais da Universidade da Califórnia, San Diego. Todos os procedimentos e protocolos receberam aprovação prévia pelo conselho de revisão institucional da UCSD.

11.2.2. Reagentes

Imiquimod (TMX, TMX-101, R-837) e Lutrol®F127 foram proporcionados por Telormedix SA (Bioggio, Suíça). O ácido láctico foi adquirido de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). A 2-(hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HP β CD) foi adquirida de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). O imiquimod foi dissolvido a uma concentração final de 1% (p/v, 41,7 mM) em ácido láctico a 0,1% (formulação de ácido láctico). O Lutrol®F127 (poloxâmero 407) foi adicionado a ácido láctico 0,1 M para fazer 20% (formulação de poloxâmero). Foi incorporado 5% de HP β CD em 16% de Lutrol®F127, em ácido láctico 0,1 M (formulação de poloxâmero-HP β CD). Todas as soluções foram filtradas por um filtro de 0,22 micrones antes da administração.

11.2.3. Estudo farmacológico in vivo

Os ratinhos foram anestesiados e cateterizados utilizando um cateter intravenoso 20G em Teflon (Terumo Co. Somerset, NJ). Foram administrados por via intravesical 150, 500 ou 1500 nmoles de imiquimod em 50 ou 100 µL de veículos, respectivamente. Foi utilizado um volume de 120 µL para instilação de 5000 nmoles. A solução de imiquimod foi mantida na bexiga durante 20 min. Os níveis de citocinas foram medidos pelo ensaios de microesferas Luminex (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de detecção mínimos de TNF α e KC foram 5 pg/mL, e 25 pg/mL, respectivamente. O nível de imiquimod no soro foi analisado por Chiman SRL (Rottofreno, Itália).

11.2.4. Exame histológico

Os ratinhos foram administrados uma vez com 100 µL de formulação de imiquimod a 0,1% em poloxâmero-HP β CD ou três vezes com 50 µL em intervalos de quatro dias. As bexigas foram recolhidas 24 horas após a última administração. As bexigas fixas foram embutidas em parafina e foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) pelo Núcleo de Histologia do Centro de Cancro da UCSD.

11.2.5. Implantação, tratamento e avaliação do tumor

Após tratamento de 20 min com poli-L-lisina (0,1 mg/mL), 1×10^6 células MB49 foram implantadas como anteriormente descrito (Hegele A, Dalpke A, Barth P et al. Antineoplastic effect of immunostimulatory ADN (CpG-ODN) in a murine C57-BL6/MB-49

transitional cell carcinoma model. Anticancer research. 2004; 24: 2225-30). O tratamento foi realizado nos dias 3, 6 e 9. Os ratinhos implantados com MB49 sem tratamento ou tratados com veículo serviram como controlos. Os ratinhos foram sacrificados no dia 11 e foi medido peso da bexiga.

11.2.6. Análise estatística

Foi utilizado um pacote de software (Prism 4.0, GraphPad, San Diego CA) para as análises estatísticas como indicado nas legendas das figuras. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

11.3. Resultados

11.3.1. Administração intravesical de imiquimod induziu inflamação sistémica

O imiquimod é conhecido como sendo insolúvel em água e pouco solúvel em solventes farmacêuticos comuns. Como se mostrou acima, uma solução de ácido acético e/ou láctico aumenta a solubilidade do imiquimod. Consequentemente, foi utilizado ácido láctico 0,1 M para preparar uma solução de imiquimod a 1% (~41,7 mM). Os ratinhos receberam por via intravesical 150, 500, 1500 e 5000 nmoles. Os TNF α e KC no soro foram induzidos de um modo dependente da dose (ácido láctico 0,1 M na Figura 22A e B). Os níveis destes factores na bexiga foram 10 a 100 vezes inferiores aos níveis no seu soro ($p < 0,001$ a 1500 e 5000 nmoles, Figura 22C e D).

11.3.2. Adição do polímero de poloxâmero evitou a absorção de imiquimod e a indução sistêmica de citocinas

A indução sistêmica de citocinas pró-inflamatórias provoca anorexia e fadiga, a chamada "síndrome de doença" nos hospedeiros (Hayashi T, Cottam HB, Chan M et al. Mast cell-dependent anorexia e hypothermia induced by mucosal activation of Toll-like receptor 7. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 295: R123-32). A fim de evitar a absorção sistêmica bem como aumentar o contacto local de imiquimod com o urotélio, foi adicionado polímero de poloxâmero termossensível, Lutrol®F127, à formulação. Os níveis de TNF α (Figura 23A e B) e KC (Figura 23C e D) no soro e na bexiga foram significativamente reduzidos em ratinhos que receberam 5000 nmoles de imiquimod nesta formulação em comparação com a formulação com ácido láctico.

Para avaliar o efeito do polímero de poloxâmero na absorção sistêmica de imiquimod através do urotélio da bexiga, os soros de ratinhos que receberam 1500 nmoles de imiquimod foram recolhidos às 2, 4, 6, 24 e 48 horas. Nos ratinhos que receberam imiquimod em ácido láctico sozinho ou em formulação de poloxâmero, a concentração máxima de imiquimod no soro foi observada 2 horas após administração (Figura 23E) ($p < 0,01$). Os níveis de imiquimod no soro aumentaram de um modo dependente da dose (Figura 23F). A adição de polímero de poloxâmero na formulação reduziu os níveis de imiquimod no soro em pontos no tempo de 2 horas ($p < 0,01$, Figura 23E) e às 5000 nmoles ($p < 0,01$, Figura 23F). Estes dados indicam que a inclusão de poloxâmero na formulação reduz significativamente a absorção sistêmica de imiquimod.

11.3.3. Incorporação de HP β CD restabelece a inflamação sistêmica e local

Para melhorar a estabilidade física e conseguir uma solução homogênea transparente e conseguir a libertação completa do polímero de poloxâmero, o imiquimod foi incorporado com HP β CD no poloxâmero em ácido láctico (formulação de poloxâmero-HP β CD). Os níveis sistêmicos de TNF α e KC foram avaliados e comparados com as outras formulações (Figura 24). A adição do polímero de poloxâmero reduziu os níveis de KC no soro até quase aos níveis de base, em comparação com a formulação de ácido láctico ($p < 0,001$, Figura 24A e 24B). A adição de HP β CD à formulação de poloxâmero restabeleceu significativamente o nível de KC no soro (Figura 24B), mas não o de TNF α (Figura 24A). Uma tendência semelhante foi observada para os níveis locais de KC (Figura 24C).

11.3.4. Avaliação da inflamação local na bexiga pela administração intravesical de imiquimod na formulação de poloxâmero-HP β CD

Para avaliar a inflamação local na bexiga, os ratinhos receberam por via intravesical formulação de imiquimod a 0,1% em poloxâmero-HP β CD como veículo. O influxo de células inflamatórias na bexiga foi avaliado por exame histológico (Figura 25). Uma vez que os doentes receberam tratamentos intravesicais repetidos na aplicação clínica, a requerente testou o efeito da administração repetida de imiquimod em formulação de poloxâmero-HP β CD nos dias 0, 4 e 8. Após a primeira instilação de imiquimod, a infiltração de células foi iniciada (Figura 25C) em comparação com o veículo sozinho

(Figura 25A). Após o terceiro tratamento foi observada infiltração substancial de células mononucleares na lâmina própria na bexiga tratada com imiquimod (Figura 25D), enquanto poucas células estavam infiltradas nas bexigas tratadas com veículo ou soro fisiológico (Figura 25B e E). Foi observada uma infiltração de células reduzida na bexiga de ratinhos com deficiência de TLR7 tratados com imiquimod em formulação de poloxâmero-HPCD semelhante à de ratinhos tratados com soro fisiológico, indicando que a inflamação induzida pelo imiquimod na bexiga era dependente de TLR7 (Figura 25F).

11.3.5. Avaliação da eficácia terapêutica em modelos de cancro da bexiga ortotópicos em ratinhos

Modelos de tumor da bexiga ortotópicos foram gerados utilizando MB49, uma linha de células derivada de carcinoma de células de transição dos aparelhos urinários de murinos. Os ratinhos portadores do tumor da bexiga MB49 foram tratados três vezes (dias 3, 6 e 9) com 50 μ L de imiquimod a 0,1% em formulação de poloxâmero-HPCD como veículo. O grupo de tratamento apresentou cargas tumorais médias significativamente inferiores em comparação com o grupo não tratado ou tratado com veículo ($p < 0,01$, Figura 26). Assim, o tratamento com imiquimod em formulação de poloxâmero-HP β CD manteve o peso da bexiga próximo àquele dos ratinhos não portadores de tumor (naive).

11.4. Discussão

Neste estudo foi utilizado polímero de poloxâmero termossensível para assegurar contacto local prolongado e

minimizar a absorção sistémica de imiquimod. A formulação de polímero reduziu a absorção sistémica de imiquimod do urotélio da bexiga com infiltração local sustentada de células imunitárias. A incorporação de HPCD na formulação melhorou a estabilidade física, originando uma solução homogénea transparente. Esta formulação melhorou a indução de quimiocina local e demonstrou efeitos antitumorais num modelo de ratinho ortotópico de cancro da bexiga.

A administração intravesical de BCG é uma imunoterapia de cancro da bexiga superficial bem estabelecida (Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet*. 1999; 353: 1689-94). Embora os bacilos de BCG vivos proporcionem uma vantagem significativa para desencadear a resposta imunológica, a utilização de BCG vivos requer cuidados de precaução biohazard para a equipa de assistência médica e doentes (Games J. Nursing implications in the management of superficial bladder cancer. *Seminars in urologic oncology*. 1996; 14: 36-40). O BCG é apenas parcialmente eficaz e podem ocorrer efeitos secundários graves, incluindo febre elevada, pneumonia, hepatite e septicemia. Continuam a ser feitos esforços para desenvolver uma terapia mais segura e eficaz para o cancro da bexiga. Entre estas foram descritas tentativas para utilizar o agonista de TLR individual para tratar o cancro da bexiga (Smith EB, Schwartz M, Kawamoto H et al. Antitumor effects of imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *The Journal of urology*. 2007; 177: 347-51; Mangsbo SM, Ninalga C, Essand M, Loskog A, Totterman TH. CpG therapy is superior to BCG in an orthotopic bladder cancer model and generates CD4+ T-cell immunity. *J Immunother*. 2008; 31: 34-42.) A aplicação repetida de agonista de TLR9 melhorou a sobrevivência e reduziu as cargas tumorais (Mangsbo SM, Ninalga

C, Essand M, Loskog A, Totterman TH. CpG therapy is superior to BCG in an orthotopic bladder cancer model and generates CD4+ T-cell immunity. *J Immunother.* 2008; 31: 34-42). O agonista de TLR7 imiquimod afecta directamente as células de cancro da bexiga humano e de ratinho para induzir secreção de quimiocinas e para induzir a apoptose e reduzir o crescimento do tumor (Smith EB, Schwartz M, Kawamoto H *et al.* Antitumor effects of imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *The Journal of urology.* 2007; 177: 2347-51).

Neste estudo foi demonstrado que o imiquimod em formulação de poloxâmero-HPCD pode iniciar uma reacção imunológica local inata substancial. Uma vez que a formulação em ácido aumentou a solubilidade do imiquimod, o imiquimod foi inicialmente testado dissolvido em ácido láctico 0,1 M, o qual é geralmente utilizado na indústria farmacêutica. O imiquimod em formulação de ácido láctico foi absorvido sistemicamente e provocou uma indução significativa de inflamação sistémica. Os bacilos de BCG vivos aderem à superfície da parede da bexiga (Atkins H, Davies BR, Kirby JA, Kelly JD. Polarisation of a T-helper cell immune response by activation of dendritic cells with CpG-containing oligonucleotides: a potential therapeutic regime for bladder cancer immunotherapy. *British journal of cancer.* 2003; 89: 2312-9; Akazawa T, Masuda H, Saeki Y *et al.* Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer research.* 2004; 64: 757-64) e proporcionam estimulação imunológica sustida para o urotélio e células imunitárias locais durante períodos prolongados. O polímero de poloxâmero termossensível reduz a libertação de fármaco e mantém a concentração de fármaco na superfície das células e evita a absorção sistémica do fármaco (Anderson BC, Pandit NK, Mallapragada SK. Understanding drug release from

poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) gels. *J Control Release*. 2001; 70: 157-67). Para recapitular as propriedades pró-inflamatórias vantajosas da infecção por bacilos de BCG vivos e para reduzir a absorção sistêmica, bem como para aumentar o contacto superficial do fármaco, foi adicionado polímero de poloxâmero termossensível à formulação de ácido láctico. A formulação de poloxâmero reduziu significativamente a absorção sistêmica de imiquimod através da superfície da bexiga e reduziu a indução sistêmica de citocinas para os níveis de base.

A componente deste estudo que foi de particular interesse foi que a formulação incluindo HP β CD restabeleceu a indução de KC pelo imiquimod em comparação com aquela de poloxâmero sozinho. A complexação utilizando HP β CD é uma abordagem comum para aumentar a solubilidade e estabilidade do fármaco em meios aquosos (Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced drug delivery reviews*. 2007; 59: 645-66. [25] Bilensoy E, Rouf MA, Vural I, Sen M, Hincal AA. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole:beta-cyclodextrin complex. *AAPS PharmSciTech*. 2006; 7: E38). Além do mais, a inclusão de HP β CD em polímeros é utilizada em sistemas de administração vaginal (Chang JY, Oh YK, Kong HS *et al.* Prolonged antifungal effects of clotrimazolecontaining mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. *J Control Release*. 2002; 82: 39-50.) Uma vez que se verificou que o poloxâmero termossensível a 20% solidifica na bexiga num intervalo de tempo curto, originando a obstrução da uretra, a concentração de poloxâmero foi reduzida até 16%. Especificamente, a incorporação de HP β CD na formulação de polímero melhorou a solubilidade aquosa e o imiquimod foi eficaz em termos de efeitos antitumorais num modelo de ratinho

ortotópico de cancro da bexiga. Esta observação apoia fortemente a utilização da formulação de poloxâmero-HPbCD em estudos clínicos subsequentes.

A imunoterapia antitumoral eficaz requer um recrutamento apropriado de células imunitárias Simons MP, O'Donnell MA, Griffith TS. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urologic oncology*. 2008; 26: 341-5; Saban MR, Simpson C, Davis C et al. Discriminators of mouse bladder response to intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *BMC immunology*. 2007; 8: 6). O exame histológico mostra infiltração substancial de células imunitárias na lâmina própria pelo imiquimod. A infiltração de células na bexiga induzida pelo imiquimod diminui em ratinhos com deficiência de TLR7, indicando que a inflamação era dependente de TLR7 e não provocada pelo veículo ou por lesão mecânica. A integridade do urotélio foi bem mantida após administração repetida de veículo sozinho (formulação de poloxâmero-HP β CD). Foi relatado que o 1V270, um conjugado de fosfolípido de um agonista de TLR7, exerce respostas imunológicas adaptativas excelentes e rápidas de Th1. Uma vez que a imunoterapia pela instilação de BCG vivos leva a uma activação imunológica adaptativa de tipo Th1 que é específica para o tumor (Luo Y, Chen X, O'Donnell MA. Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN- γ production: cytokine promotion and simulation of BCG effect. *Cytokine*. 2003; 21: 17-26), o conjugado de fosfolípido tem potencial para melhorar a potência terapêutica do agonista de TLR7 não conjugado no cancro da bexiga.

Em resumo, estes resultados sugerem que a formulação de poloxâmero e HP β CD de fármacos com baixa solubilidade pode exercer propriedades favoráveis, tais como perfil de libertação

lento e contacto superficial maior, enquanto evita os possíveis efeitos sistémicos desfavoráveis. As formulações de poloxâmero-HPCD optimizadas podem aumentar a dose tolerada máxima de imiquimod e melhorar a adesão à terapêutica pelo doente.

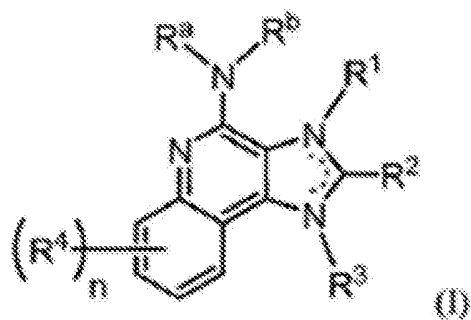
Lisboa, 21 de Janeiro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica compreendendo uma imidazoquinolin(amina) e ácido láctico para ser utilizada num método para o tratamento de doenças da bexiga, em que a imidazoquinolin(amina) na composição farmacêutica é seleccionada de um composto definido por um dos seguintes grupos (a), (b) e (c):

a) 1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina;

b) um composto de imidazoquinolin(amina) seleccionado da fórmula (I) seguinte:



em que

R^1 , R^2 e R^3 são, cada, independentemente seleccionados de hidrogénio; alquilo cíclico de três, quatro ou cinco átomos de carbono; alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo um a dez átomos de carbono e alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada substituído contendo um a dez átomos de carbono, em

que o substituinte é seleccionado do grupo consistindo de cicloalquilo contendo três até seis átomos de carbono e cicloalquilo contendo três até seis átomos de carbono substituído com alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo um a quatro átomos de carbono; fluoro- ou cloroalquilo contendo desde um a dez átomos de carbono e um ou mais átomos de flúor ou cloro; alcenilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo dois até dez átomos de carbono e alcenilo de cadeia linear ou cadeia ramificada substituído contendo dois até dez átomos de carbono, em que o substituinte é seleccionado do grupo consistindo de cicloalquilo contendo três até seis átomos de carbono e cicloalquilo contendo três até seis átomos de carbono substituído com alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo um a quatro átomos de carbono; hidroxialquilo de um a seis átomos de carbono; alcoxialquilo em que a porção alcoxilo contém um a quatro átomos de carbono e a porção alquilo contém um a seis átomos de carbono; aciloxialquilo em que a porção aciloxilo é alcanoiloxilo com dois até quatro átomos de carbono ou benzoiloxilo, e a porção alquilo contém um a seis átomos de carbono, com a condição de que qualquer um desses grupos alquilo, alquilo substituído, alcenilo, alcenilo substituído, hidroxialquilo, alcoxialquilo ou aciloxialquilo não tem um átomo de carbono completamente substituído ligado directamente ao átomo de azoto; benzilo; (fenil)etilo; e fenilo; estando o referido substituinte benzilo, (fenil)etilo ou fenilo opcionalmente substituído no anel benzeno com um ou duas porções independentemente seleccionadas do grupo

consistindo de alquilo de um a quatro átomos de carbono, alcóxido de um a quatro átomos de carbono e halogénio, com a condição de que quando o referido anel benzeno está substituído com duas das referidas porções, então as porções em conjunto contêm não mais do que seis átomos de carbono;

$-\text{CHR}_x\text{R}_y$, em que R_y é hidrogénio ou uma ligação carbono-carbono, com a condição de que quando R_y for hidrogénio R_x é alcóxido de um a quatro átomos de carbono, hidroxialcóxido de um a quatro átomos de carbono, 1-alcinilo de dois até dez átomos de carbono, tetra-hidropirânico, alcóxialquilo em que a porção alcóxido contém um a quatro átomos de carbono e a porção alquilo contém um a quatro átomos de carbono, 2-, 3-, ou 4-piridilo, e com a condição adicional de que quando R_y for uma ligação carbono-carbono, R_y e R_x formam em conjunto um grupo tetra-hidrofuranilo opcionalmente substituído com um ou mais substituintes independentemente seleccionados do grupo consistindo de hidróxido ou hidroxialquilo de um a quatro átomos de carbono;

alquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo um a oito átomos de carbono, hidroxialquilo de cadeia linear ou cadeia ramificada contendo um a seis átomos de carbono, morfolinometilo, benzilo, (fenil)etilo e fenilo, estando o substituinte benzilo, (fenil)etilo ou fenilo opcionalmente substituído no anel benzeno com uma porção seleccionada do grupo consistindo de metilo, metóxido ou halogénio;

$-C(R_S)(R_T)(X)$ em que R_S e R_T são independentemente seleccionados do grupo consistindo de hidrogénio, alquilo de um a quatro átomos de carbono, fenilo e fenilo substituído em que o substituinte é seleccionado do grupo consistindo de alquilo de um a quatro átomos de carbono, alcóxido de um a quatro átomos de carbono e halogénio;

X é alcóxido contendo um a quatro átomos de carbono, alcóxialquilo em que a porção alcóxido contém um a quatro átomos de carbono e a porção alquilo contém um a quatro átomos de carbono, haloalquilo de um a quatro átomos de carbono, alquilamido em que o grupo alquilo contém um a quatro átomos de carbono, amino, amino substituído em que o substituinte é alquilo ou hidroxialquilo de um a quatro átomos de carbono, azido, alquiltio de um a quatro átomos de carbono, ou morfolinoalquilo em que a porção alquilo contém um a quatro átomos de carbono;

R^4 é hidrogénio, alquilo C_{1-8} , alcóxido C_{1-8} ou halo;

n é 1, 2, 3 ou 4;

R^a e R^b são, cada, independentemente, hidrogénio, alquilo(C_1-C_6), hidroxialquilo(C_1-C_6), aminoalquilo(C_1-C_6), aminossulfonilo, alcanóilo(C_1-C_6), arilo ou benzilo, estando todos eles opcionalmente substituídos com um ou mais grupos amino; ou

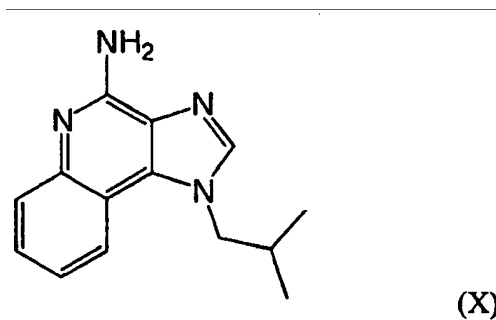
R^a e R^b em conjunto com o azoto ao qual estão ligados formam um grupo pirrolidino, piperidino ou morfolino;

as linhas a tracejado no anel de cinco membros da fórmula (I) acima denotam uma ligação opcional que liga um azoto do anel de cinco membros ao carbono que está entre os dois azotos do anel de cinco membros, e quando a ligação está presente, R^1 ou R^3 está ausente;

na condição de que R^a e R^b em conjunto permitam formar um íon amónio quaternário no azoto do elemento estrutural central $N(R^a)(R^b)$ ou por qualquer íon amónio quaternário que é proporcionado por R^a e/ou R^b ;

ou um seu sal farmacêuticamente aceitável; e

c) imiquimod, possuindo a fórmula específica 1-isobutil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, seleccionada da fórmula (X) seguinte:



2. Composição farmacêutica para utilização de acordo com a reivindicação 1, compreendendo a composição farmacêutica ainda, pelo menos, um agente termossensível, em que o, pelo menos, um agente termossensível é seleccionado de quitosano, ou de um copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (também designado PEO-PPO-PEO ou poloxâmico).

3. Composição farmacêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, compreendendo a composição farmacêutica ácido láctico numa concentração de 0,025 M a 0,200 M, de um modo preferido, numa concentração de 0,025 M a 0,100 M ou numa concentração de 0,100 M a 0,200 M ou numa concentração de 0,075 a 1,125 M.
4. Composição farmacêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, compreendendo a composição farmacêutica imidazoquinolin(amina) numa quantidade de 0,005% (p/v) a 5% (p/v), incluindo uma quantidade de 0,01% (p/v) a 5% (p/v), uma quantidade de 0,1% (p/v) a 4% (p/v), uma quantidade de 0,1% (p/v) a 3% (p/v), uma quantidade de 0,2% (p/v) a 2% (p/v), uma quantidade de 0,2% (p/v) a 1% (p/v), uma quantidade de 0,5% (p/v) a 1% (p/v) ou uma quantidade de 0,1% (p/v) a 1% (p/v).
5. Composição farmacêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4:
 - i) em que a composição farmacêutica compreende ainda uma ou mais ciclodextrina(s), seleccionadas de α -ciclodextrinas, β -ciclodextrinas, γ -ciclodextrinas, δ -ciclodextrinas e ϵ -ciclodextrinas, de um modo preferido, de β -ciclodextrinas, incluindo hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD); em particular, compreendendo a(s) ciclodextrina(s) numa quantidade de 0,1% (p/v) a 30% (p/v), tipicamente numa quantidade de 1% (p/v) a 20% (p/v), de um modo preferido, numa quantidade de 2% (p/v) a 20% (p/v), de um modo mais preferido, numa quantidade de 5% (p/v) a 20% (p/v), de um modo ainda mais preferido, numa quantidade de 5% (p/v) a 15%

(p/v) e, de um modo muito preferido, numa quantidade de 10% (p/v) a 15% (p/v) ou numa quantidade de 2% (p/v) a 6% (p/v); e/ou

ii) em que a composição farmacêutica compreende, pelo menos, um agente termossensível, em que o, pelo menos, um agente termossensível é seleccionado de quitosano ou de um copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (também designado PEO-PP0-PEO ou poloxâmero) e, em que o, pelo menos, um agente termossensível exhibe uma "temperatura de solução crítica inferior" (LCST) específica medida à pressão ambiente numa gama de 15 °C a 35 °C, de um modo mais preferido, numa gama de 15 °C a 30 °C, de um modo ainda mais preferido, numa gama de 15 ou 20 °C ou 25 °C a 30 °C, de um modo muito preferido, numa gama de 15 ou 20 °C a 25 °C.

6. Composição farmacêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, compreendendo a composição farmacêutica o, pelo menos, um agente termossensível numa quantidade de 0,1% (p/v) a 40% (p/v), tipicamente numa quantidade de 2% (p/v) a 30% (p/v), de um modo preferido, numa quantidade de 5% (p/v) a 30% (p/v), de um modo mais preferido, numa quantidade de 10% (p/v) a 30% (p/v) e, de um modo muito preferido, numa quantidade de 10% (p/v) a 25% (p/v) ou numa quantidade de 10% (p/v) a 20% (p/v); em particular, em que quaisquer dois dos agentes termossensíveis estão contidos na composição farmacêutica como uma mistura numa proporção de 1:20 a 20:1, incluindo um proporção de 1:20, 2:20, 3:30, 4:20, 5:20, 6:20, 7:20, 8:20, 9:20, 10:20, 11:20, 12:20, 13:20, 14:20, 15:20, 16:20, 17:20, 18:20, 19:20, 20:20 (= 1:1), ou numa

proporção de 20:20, 19:20, 18:20, 17:20, 16:20, 15:20, 14:20, 13:20, 12:20, 11:20, 10:20, 9:20, 8:20, 7:20, 6:20, 5:20, 4:20, 3:20, 2:20, ou 1:20, ou numa gama formada por quaisquer dois dos valores de proporção como definidos antes.

7. Composição farmacêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, em que o, pelo menos, um agente termosensível é Poloxâmero 407 e/ou Poloxâmero 188 ou uma mistura de Poloxâmero 407 e Poloxâmero 188.

8. Composição farmacêutica para utilização de acordo com a reivindicação 7:

i) em que o, pelo menos, um agente termosensível é Poloxâmero 407 numa quantidade de 10% (p/v) a 25% (p/v) ou numa quantidade de 12% (p/v) a 25% (p/v), em particular em que o, pelo menos, um agente termosensível é Poloxâmero 407 numa quantidade (total) de 17,5% (p/v)/(p/p) a 22,5% (p/v)/(p/p), de um modo preferido, numa quantidade (total) total de 17,5% (p/v)/(p/p), de 18,0% (p/v)/(p/p), de 18,5% (p/v)/(p/p), de 19,0% (p/v)/(p/p), de 19,5% (p/v)/(p/p), de 20,0% (p/v)/(p/p), de 20,5% (p/v)/(p/p), de 21,0% (p/v)/(p/p), de 21,5% (p/v)/(p/p), de 22,0% (p/v)/(p/p), ou de 22,5% (p/v)/(p/p), ou qualquer gama formada por quaisquer dois destes valores; ou

ii) em que o, pelo menos, um agente termosensível é uma mistura de Poloxâmero 407 e Poloxâmero 188 numa quantidade (total) de 22,5% (p/v)/(p/p) a 27,5% (p/v)/(p/p), de um modo mais preferido, numa quantidade total de 25% (p/v)/(p/p), e

numa proporção de Poloxâmero 407:Poloxâmero 188 de 15:5, 16:4, 17:3, 18:2, 19:1 ou 20:1, ou uma gama formada por quaisquer dois destes valores de proporção, de um modo mais preferido, numa proporção de 9,5:0,5, de 9:1, de 8,5:1,5, ou de 8:2, ou uma gama formada por quaisquer dois destes valores de proporção.

9. Composição farmacêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, compreendendo a composição farmacêutica ácido láctico numa concentração de 0,025 a 0,2 M, de um modo preferido, numa concentração de 0,075 a 1,125 M, imidazoquinolin(amina) numa quantidade de 0,1% (p/v) a 1% (p/v), ciclodextrina(s) numa quantidade de 2% (p/v) a 6% (p/v) e Poloxâmero 407 numa quantidade de 10% (p/v) a 25% (p/v), de um modo preferido, numa quantidade de 12% (p/v) a 25% (p/v).
10. Composição farmacêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que as doenças da bexiga são seleccionadas de cancro da bexiga e cistite.
11. Composição farmacêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 para o tratamento intravesical de doenças da bexiga, em particular, em que as doenças da bexiga são cistite e cancro da bexiga.
12. Utilização de uma composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de doenças da bexiga, incluindo cancro da bexiga e cistite, compreendendo administrar uma composição farmacêutica como definida em

qualquer uma das reivindicações 1 a 11 a um doente necessitada da mesma.

13. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que a composição farmacêutica é administrada por via intravesical e/ou em que as doenças da bexiga são cistite e cancro da bexiga.

Lisboa, 21 de Janeiro de 2014

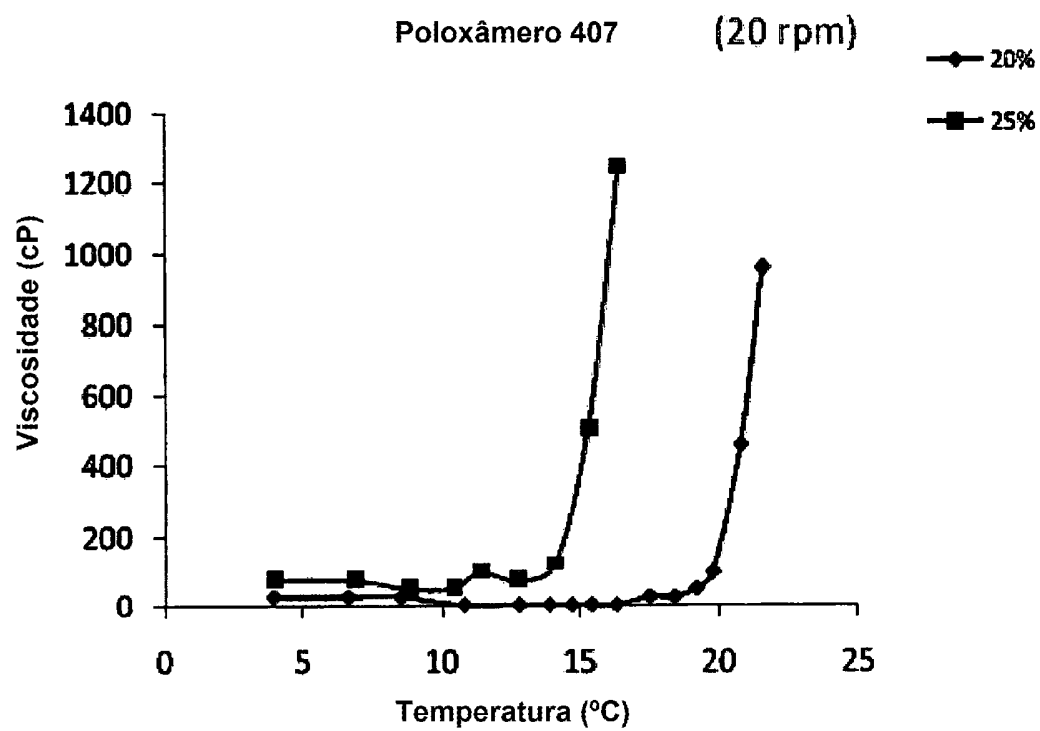


Figura 1

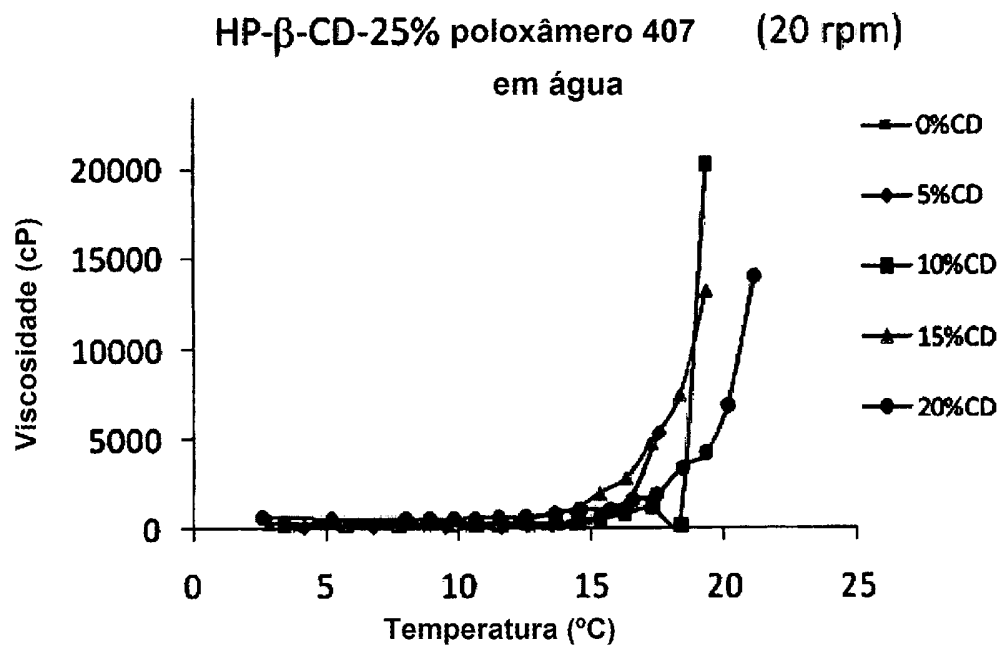


Figura 2

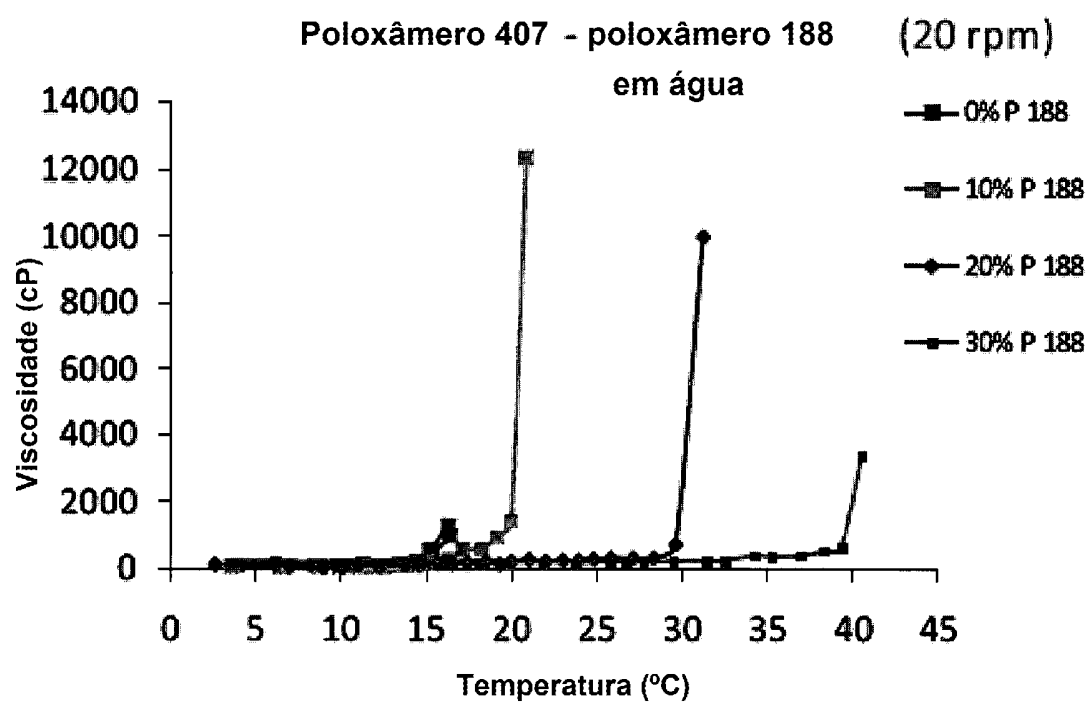


Figura 3

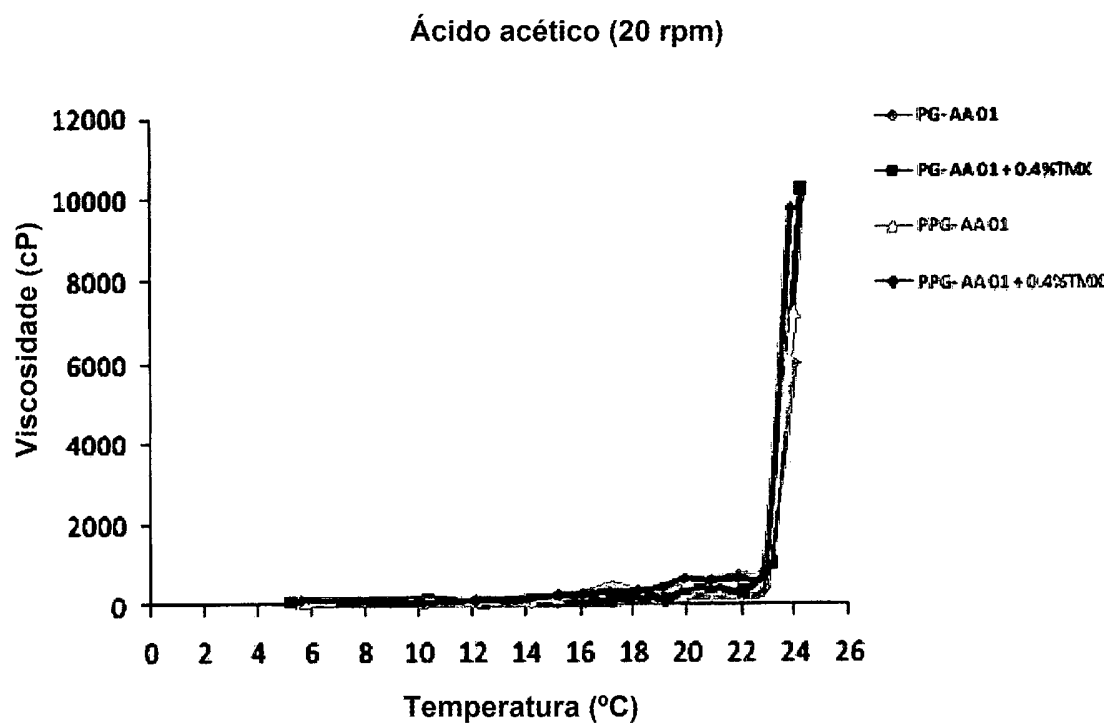


Figura 4

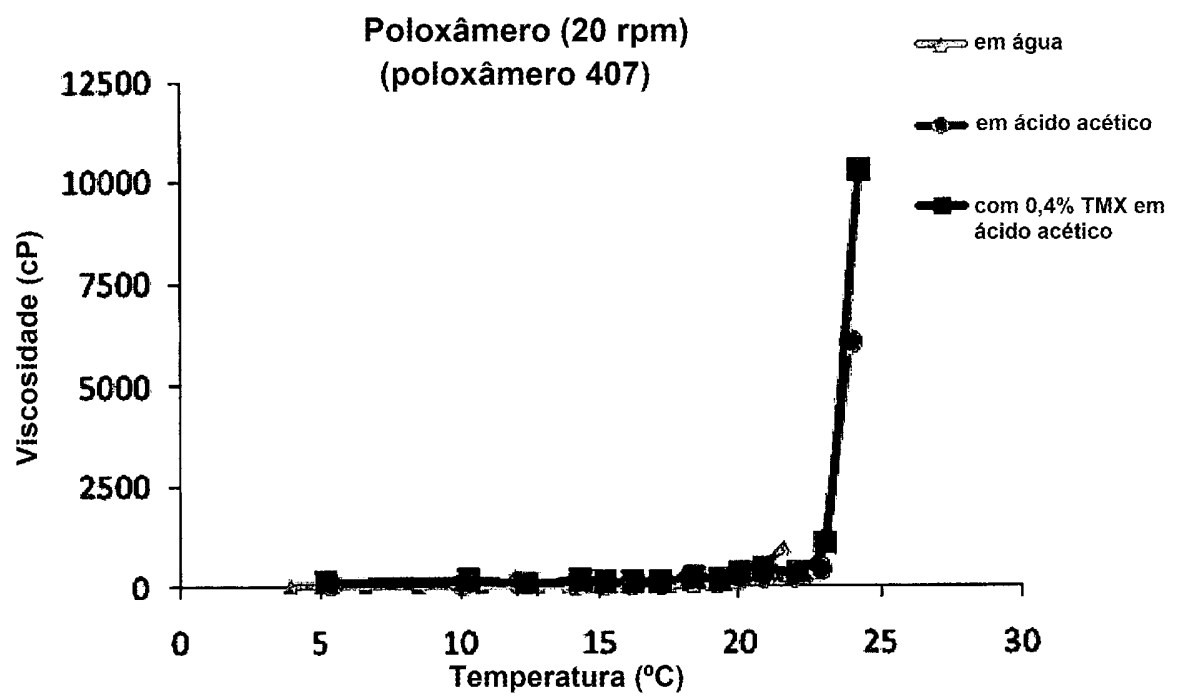


Figura 5

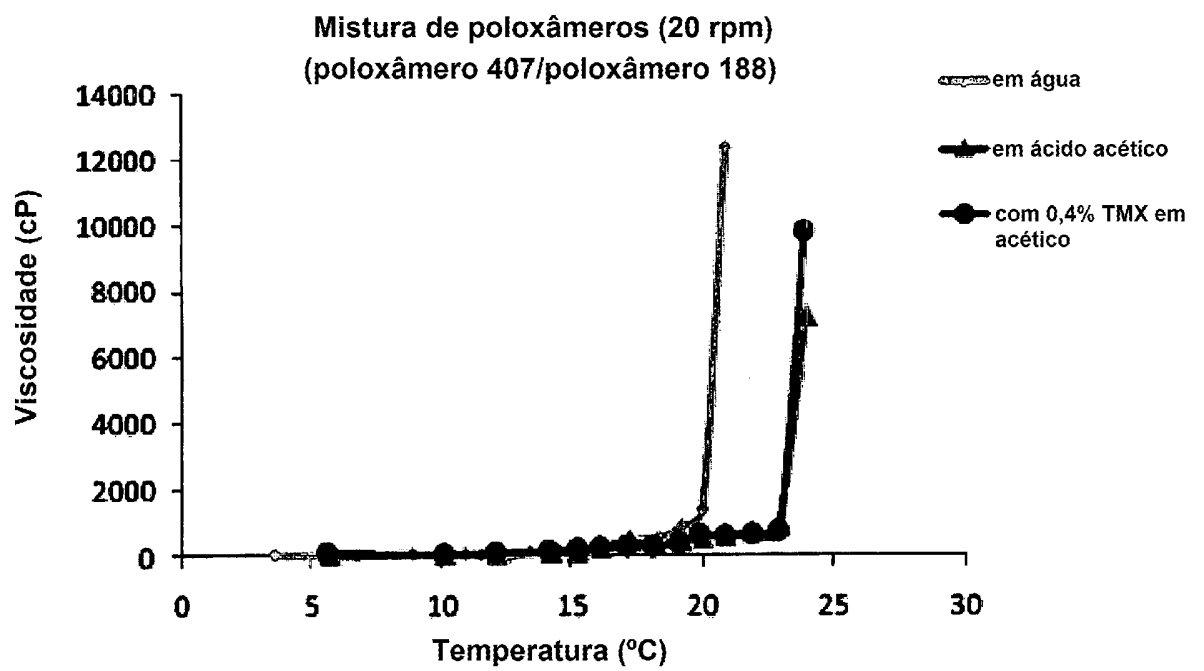


Figura 6

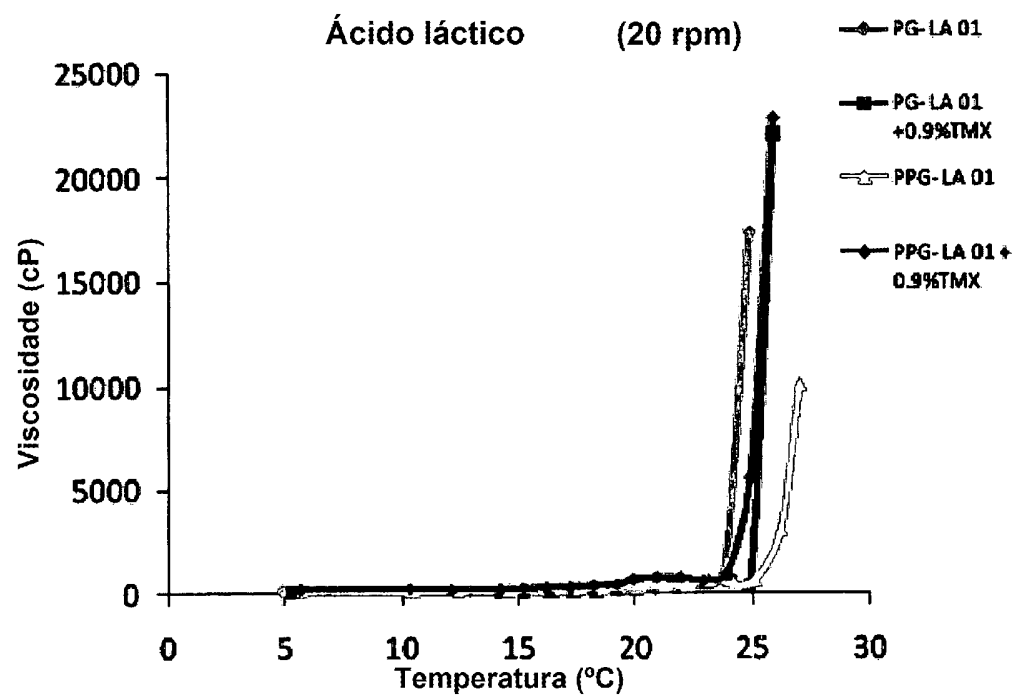


Figura 7

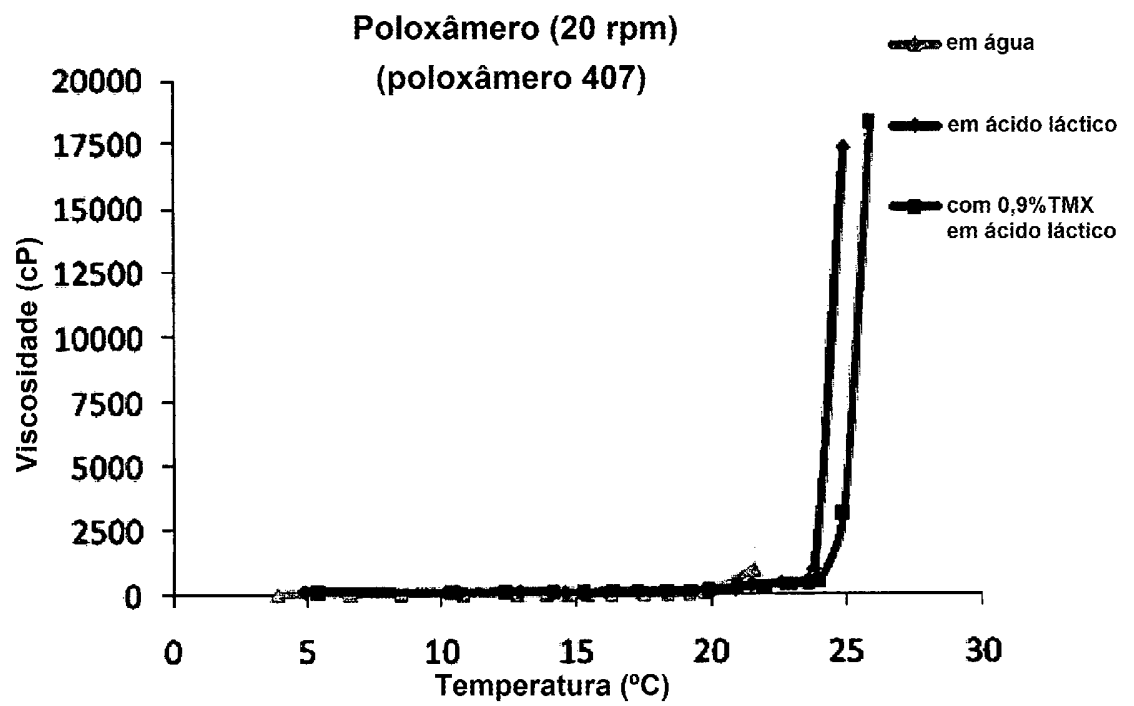


Figura 8

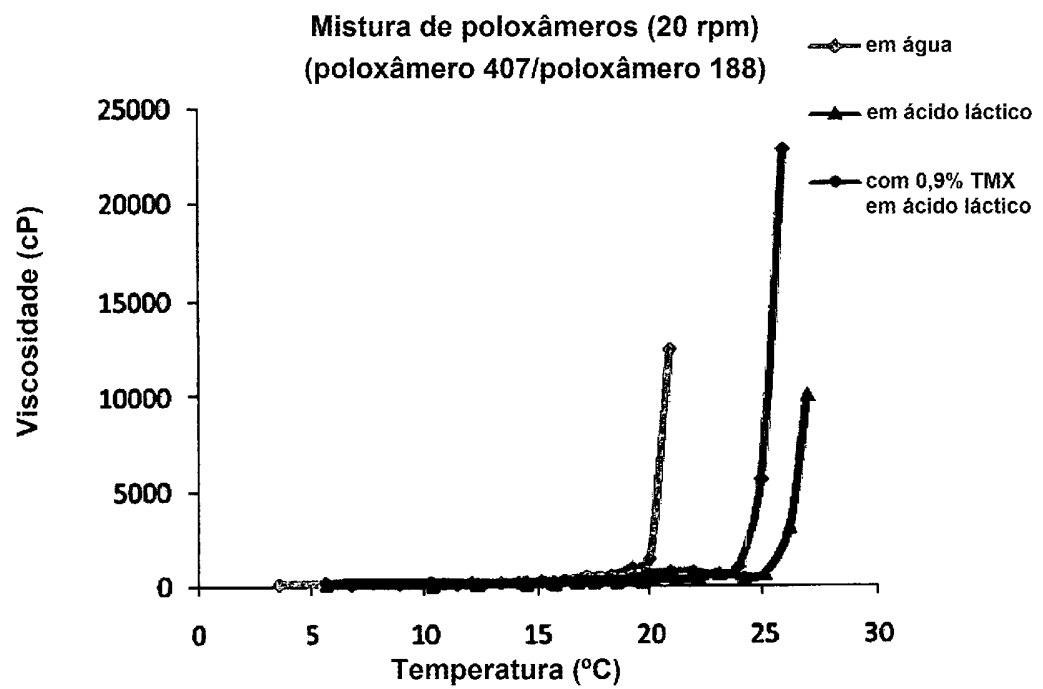
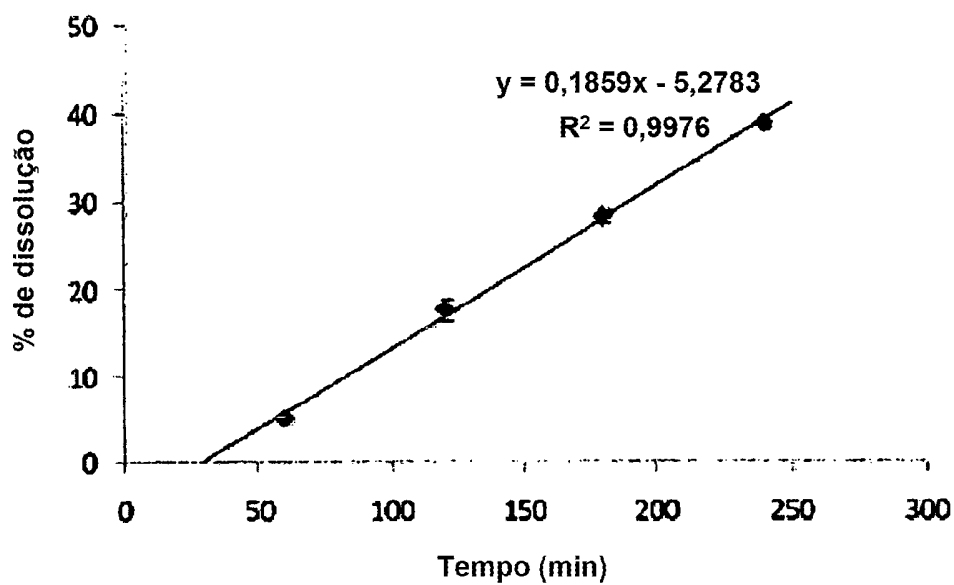
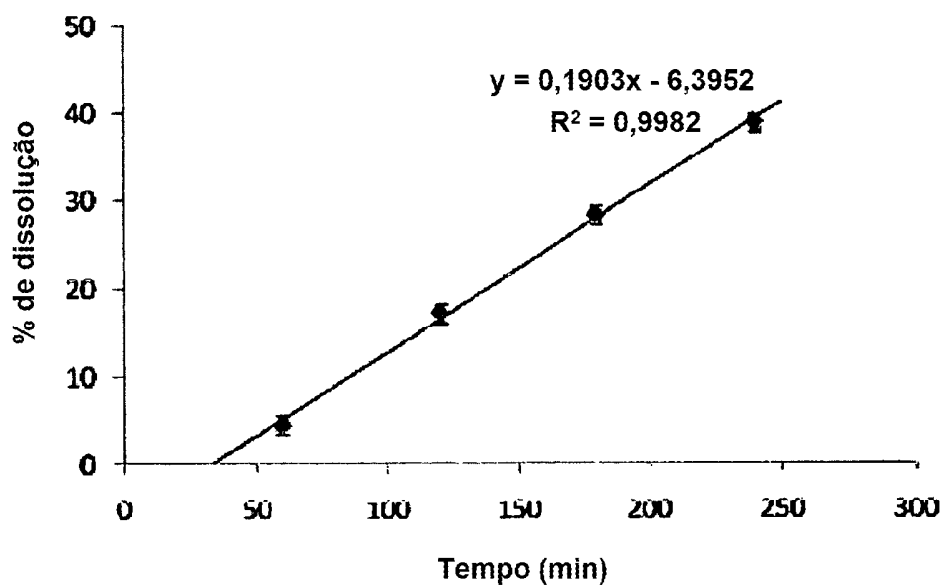


Figura 9

PG-LA01**TMX PG-LA01****Figura 10**

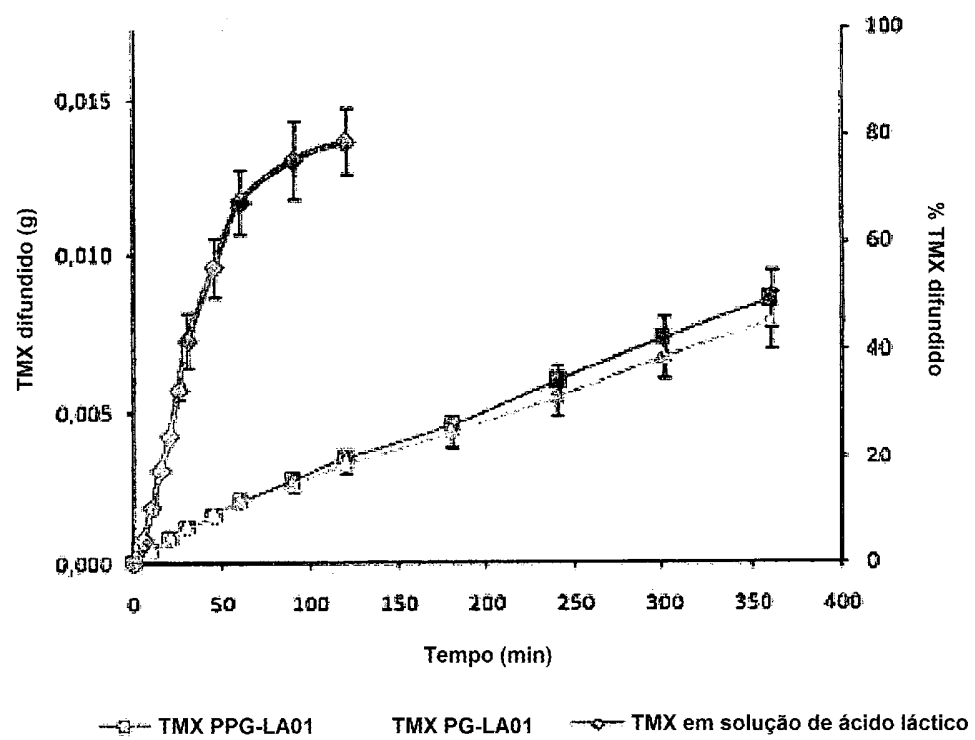


Figura 11

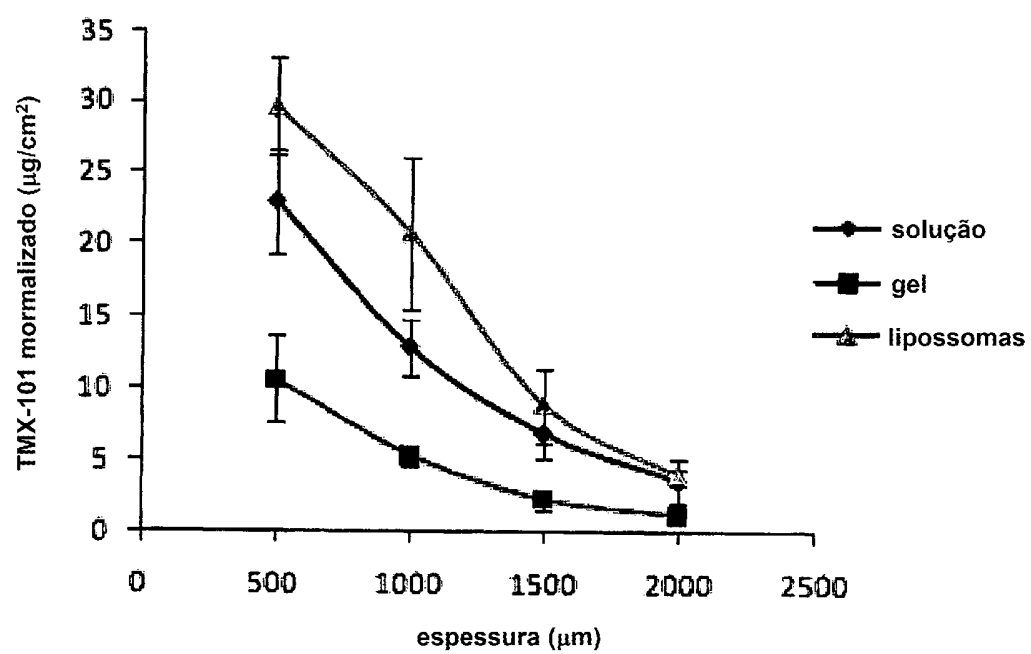


Figura 12

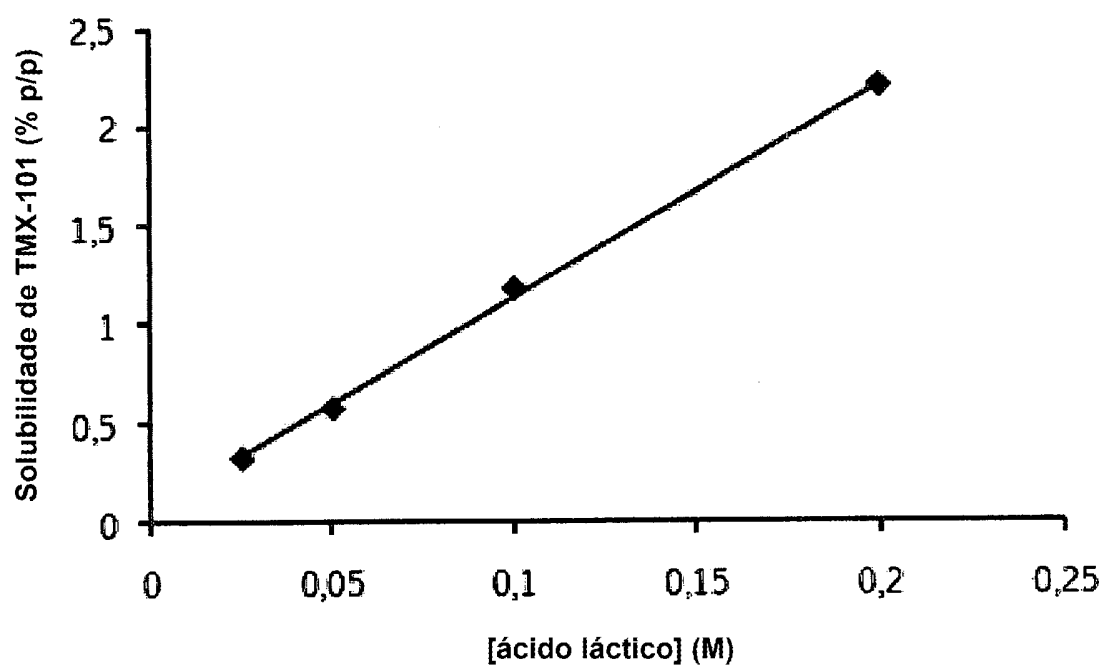


Figura 13

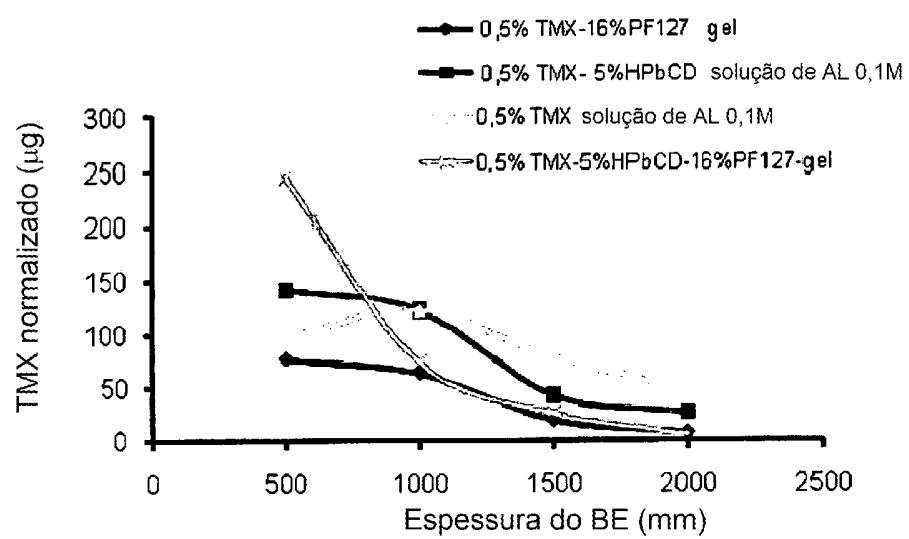
A



B



Figura 14

**Figura 15**

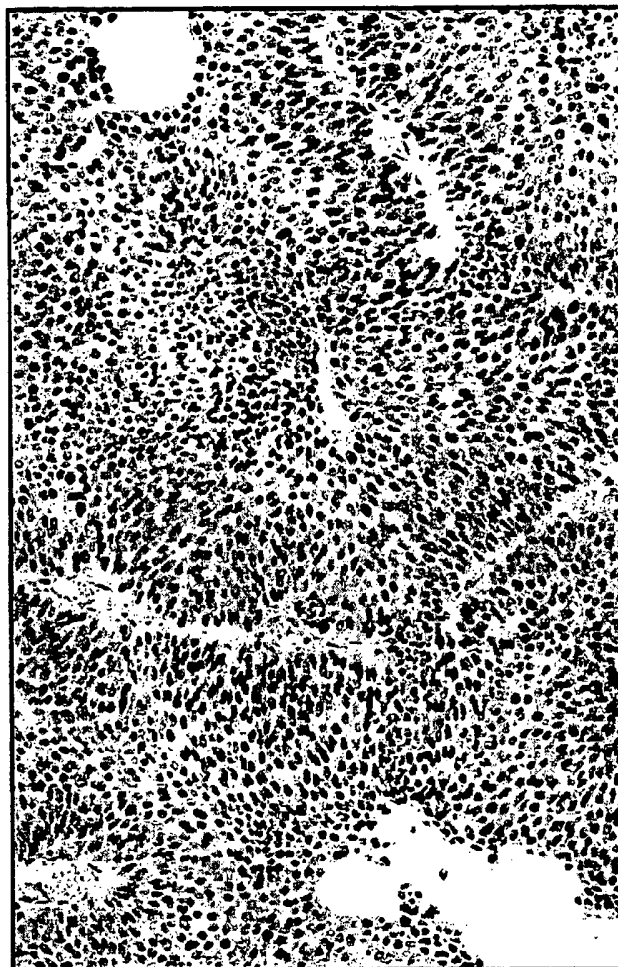


Figura 16



Figura 17

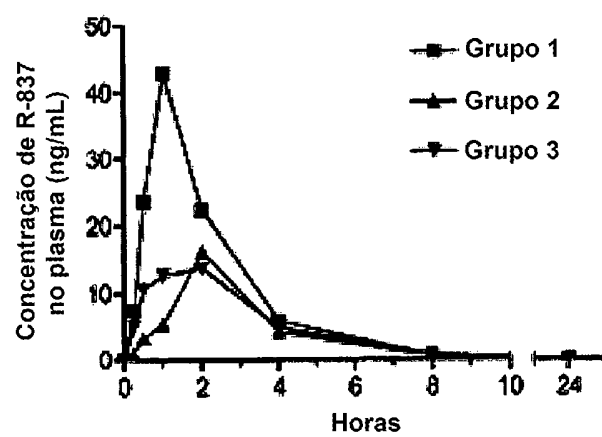


Figura 18



Figura 19



Figure 20



Figura 21

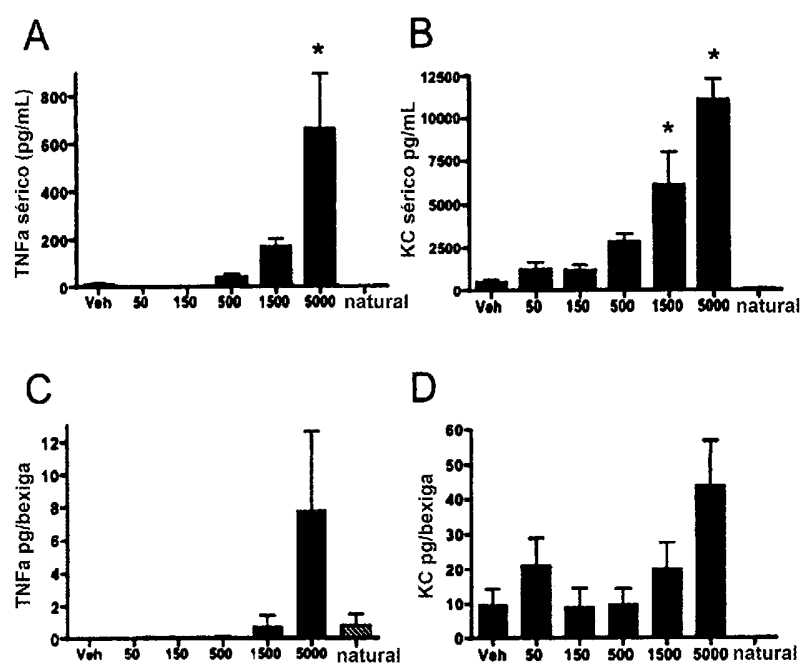


Figura 22

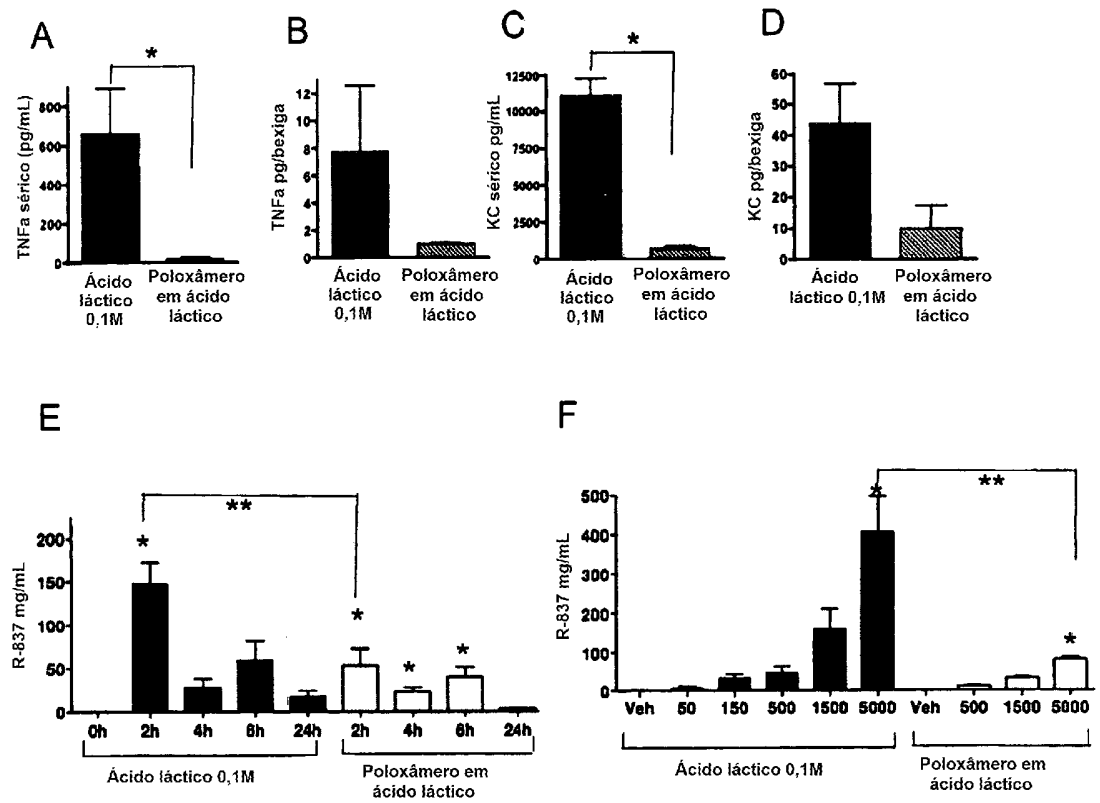


Figura 23

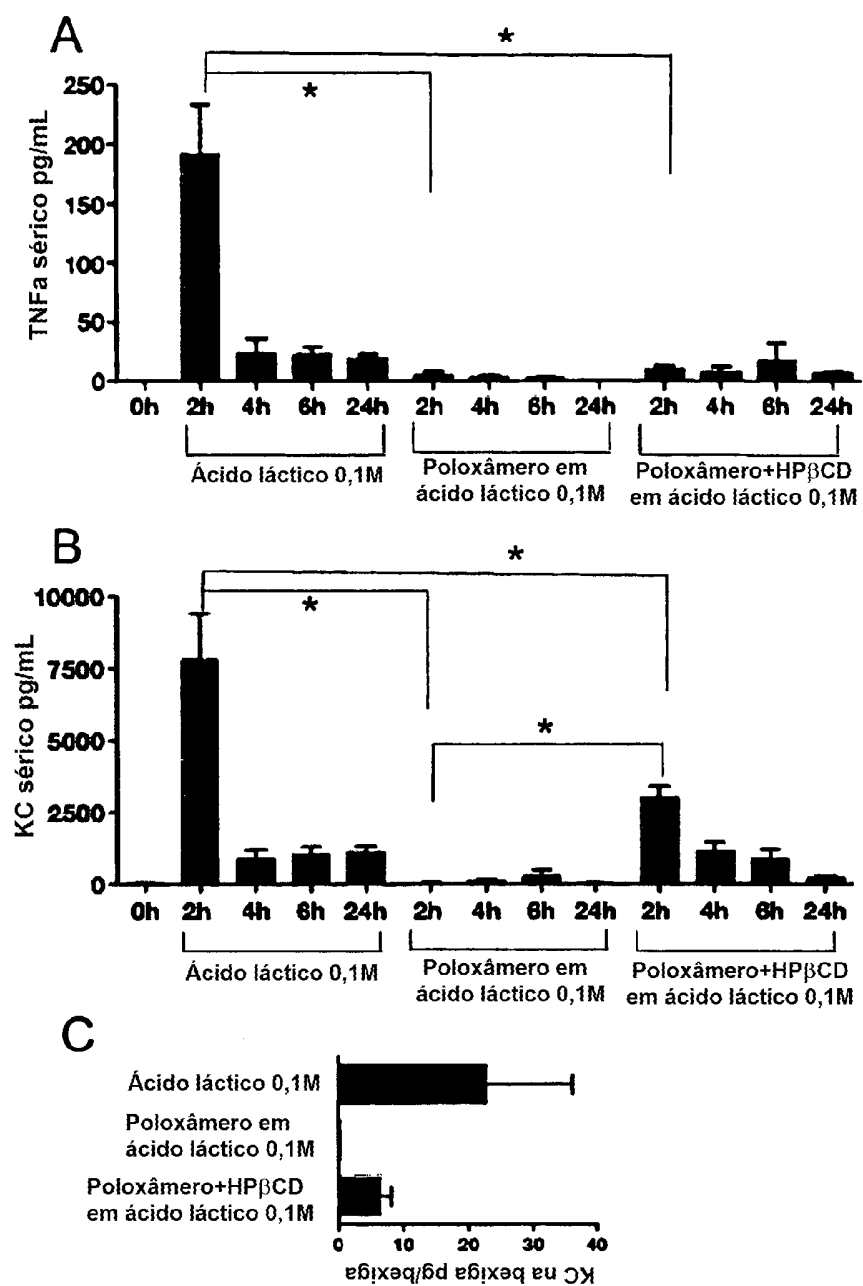


Figura 24

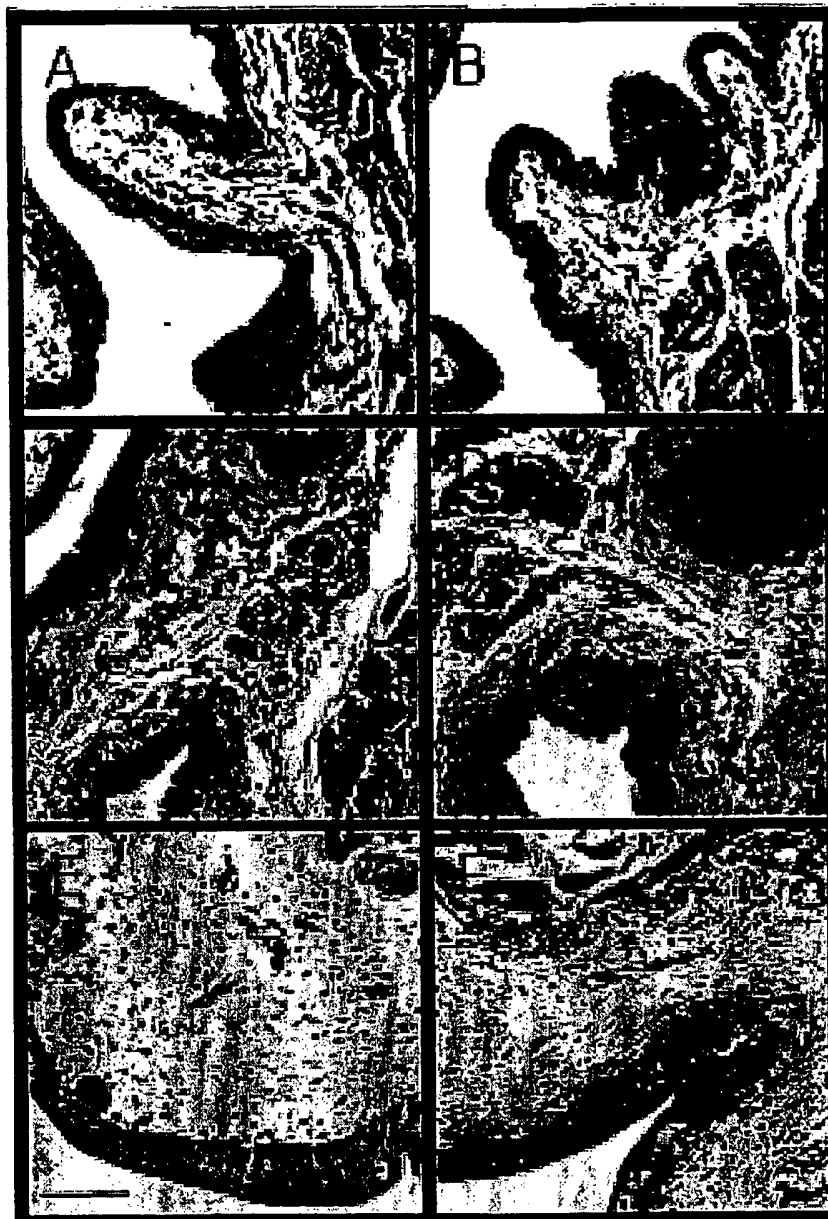
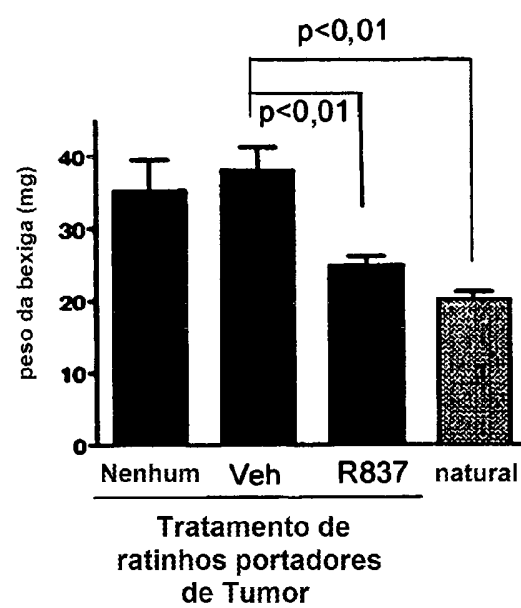


Figura 25

**Figura 26**