



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0803473-7 B1**



**(22) Data do Depósito: 18/09/2008**

**(45) Data de Concessão: 16/07/2019**

---

**(54) Título:** NANOPARTÍCULA DE ALBUMINA TRANSPORTADORA DE FÁRMACOS PARA TERAPIA FOTODINÂMICA E SEU PROCESSO DE PREPARO

**(51) Int.Cl.:** A61K 9/51; A61K 47/38; C07D 487/22.

**(52) CPC:** A61K 9/51; A61K 47/38; C07D 487/22.

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP; FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP.

**(72) Inventor(es):** ANTÔNIO CLAUDIO TEDESCO; ANDREZA RIBEIRO SIMIONI.

**(57) Resumo:** A presente invenção pertence ao campo das nanopartículas utilizadas em sistemas de entrega de drogas, (drug delivery systems - DDS). Especificamente, as nanopartículas da presente invenção são formadas por proteínas ou polímeros biodegradáveis que sofrem alteração na sua estrutura tridimensional durante o preparo da partícula. Especificamente, o princípio ativo utilizado na presente invenção é um composto utilizado na terapia fotodinâmica. A presente invenção também versa sobre um processo para a preparação de tais partículas e do uso das mesmas.

### **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

“NANOPARTÍCULA DE ALBUMINA TRANSPORTADORA DE FÁRMACOS PARA TERAPIA FOTODINÂMICA E SEU PROCESSO DE PREPARO”

#### **Campo da Invenção**

[001] A presente invenção pertence ao campo das nanopartículas utilizadas em sistemas de entrega de drogas (SED) (*drug delivery systems* - DDS). Especificamente, as nanopartículas da presente invenção são formadas por proteínas, peptídeos ou sequências e fragmentos de peptídeos e/ou polímeros biodegradáveis que sofrem alteração na sua estrutura tridimensional durante o preparo da partícula. Especificamente, o princípio ativo utilizado na presente invenção é um composto utilizado na terapia fotodinâmica (TFD) e em processos fotodinâmicos (PFD) aplicados a diversas áreas (tais como odontologia, veterinária, neurologia, ortopedia) e se estende a outros ativos, não necessariamente, ativados por luz.

[002] A presente invenção também versa sobre um processo para a preparação de tais partículas, de composições farmacêuticas compreendendo tais partículas e também a métodos de entrega de compostos terapêuticos a partir do uso desta nanopartícula.

#### **Antecedentes da Invenção**

[003] A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação de drogas, frequentemente descritos como “*drug delivery systems*” (DDS), oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional como, por exemplo, uma maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação.

[004] Neste contexto, a utilização destes sistemas de liberação controlada de fármacos envolve um vasto campo de estudos e tem reunido muitos esforços, atualmente, na área de nanopartículas e micropartículas, com enfoque nos sistemas de polímeros biodegradáveis.

[005] O sistema de entrega de drogas é um sistema em que o direcionamento do fármaco a sítios-alvo específicos do organismo é claramente identificável, sendo também bastante estável, não sendo reconhecido por macrófagos do sistema reticuloendotelial de defesa. Trata-se, portanto, de um sistema para se investigar o comportamento de carregadores coloidais em organismos vivos, estritamente ligados à liberação controlada de fármacos.

[006] Com base nestas considerações, a presente invenção combina as propriedades dos *SED* para veiculação de classes de compostos ativos de origem protéica, como peptídeos, fragmentos de peptídios, fatores de crescimentos, drogas anti-neoplásicas, ativos para epilepsia, neurotransmissores, ortopedia, indução de restauração nervosa e também de agentes ou fármacos fotossensibilizadores ou fotossensíveis, que são empregados em uma nova e recente vertente dentro da área terapêutica denominada Terapia Fotodinâmica (TFD) ou, mais genericamente, Processos Fotodinâmicos (PFD) para tratamento dos mais diversos tipos de patologias incluindo câncer, doenças bacterianas, micose, doenças fúngicas, doenças degenerativas do sistema nervoso, re-estabelecimento de nervos e terminações nervosas, etc. Todos esses compostos podem ser veiculados dessa mesma forma com excelentes efeitos sobre tecidos e organismos com patologia.

[007] A TFD é uma modalidade terapêutica minimamente invasiva. O tratamento consiste na administração sistêmica de um agente fotossensibilizador (fármaco) seguido pela exposição da lesão à luz visível, o que resulta na regressão necrose ou apoptose celular da região lesada.

[008] O fármaco pode ser administrado tópica, parenteral ou intravenosamente no paciente e, após a acumulação seletiva e preferencial deste no tecido danificado, uma luz laser de potência adequada (baixa, média ou alta) é irradiada através de uma sonda de fibra óptica e focalizada sobre o tumor ou alvo biológico escolhido. A luz ativa o fármaco, que libera agentes citotóxicos que destroem as células doentes, ou desencadeiam outras respostas celulares que levam a destruição das mesmas.

[009] A importância dos sistemas de liberação reside no fato de que raramente um fármaco, veiculado em solução aquosa ou numa forma convencional, consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado. Assim, a seletividade tumoral pode ser melhorada através do uso de formulações adequadas, resultando também numa excelente biodistribuição do ativo.

[010] Esta invenção abrange o preparo e a utilização destes novos sistemas farmacêuticos (micro e nanopartículas proteicas) para emprego em TFD e PFD os quais possuem características nanoestruturadas poliméricas para liberação controlada dos mais diferentes tipos e derivados de agentes fotossensibilizadores.

[011] A presente invenção se baseia na utilização da nanotecnologia para o desenvolvimento de um novo sistema de liberação controlado de fármacos, sejam eles fotossensíveis, quimioterápicos, peptídeos e fragmentos de peptídeos, proteínas recombinantes, fatores de crescimento, drogas neurotrópicas, oftalmológicas, anestésicas locais ou sistêmicas, dentre outros, que possam ser úteis seja no ramo da saúde ou em qualquer uma das áreas que empregue o uso desta nova fronteira da ciência.

[012] Existem partículas comercialmente disponíveis bastante semelhantes à partícula proposta na presente invenção, em especial o medicamento Abraxane<sup>®</sup>. Esta é uma formulação de nanopartículas de albumina que transportam o quimioterápico taxol e está protegida pelos documentos US 5,439,686, US 5,498,421, US 6,096,331, US 6,506,405, US 6,537,579, US 6,749,868 e US 6,753,006.

[013] O documento US 5,439,686 descreve o processo de formação de uma nanopartícula de um polímero biocompatível. Em especial, o polímero biocompatível descrito neste documento faz ligação cruzada pela formação de pontes dissulfeto durante o processo de formação da partícula. Como exemplo de polímero biocompatível, o documento cita proteínas que contém o aminoácido cisteína, tal como a albumina. O documento descreve ainda que o processo de

preparo desta partícula é pela sonicação de tipo de uma mistura que compreende o composto ativo dissolvido em um óleo, e uma solução aquosa de albumina.

[014] O processo de preparo da partícula descrita na presente invenção difere da partícula apresentada neste documento pela etapa de emulsificação ocorrer em duas etapas sendo que na primeira delas, uma solução de albumina com o fármaco encontra-se à temperatura ambiente e na segunda etapa, a emulsão encontra-se aquecida à temperaturas entre 70 e 110 °C. Além disso, a partícula obtida na presente invenção destina-se ao transporte tanto de fármacos solúveis quanto de fármacos insolúveis em água, diferentemente da partícula descrita neste documento do estado da técnica, que limita-se apenas ao transporte de fármacos insolúveis.

[015] O documento US 5,133,908 descreve o processo de preparo de uma nanopartícula de albumina que compreende o preparo de uma solução aquosa de albumina e do princípio ativo à temperatura ambiente que é posteriormente adicionada à água desmineralizada fervente. Este documento descreve que qualquer substância pode ser incorporada à essa partícula.

[016] O método de preparo descrito neste documento difere do método utilizado na sua invenção pelo fato da solução aquosa que compreende a albumina e o princípio ativo compreender também um óleo e pela etapa de desnaturação ser realizada com um óleo quente em vez da água fervente.

[017] O documento US 6,528,067 descreve uma nanopartícula de albumina cujo método de preparo compreende as etapas de preparar uma solução contendo albumina, aminoácidos, açúcar e eletrólitos, adicionar um óleo, homogenizar a mistura por irradiação ultrassônica e remover a água. Vários tipos de óleos vegetais podem ser utilizados na presente invenção tais como o óleo de soja, oliva, girassol, algodão dentre outros possíveis bem como a mistura dos mesmos. O documento revela que a remoção de água é realizada pelo método da liofilização e qualquer fármaco pode ser incorporado nesta partícula.

[018] A partícula da presente invenção difere da partícula descrita neste documento pela solução de albumina não compreender aminoácidos e/ou açúcares e também por compreender duas etapas de emulsificação realizadas

em diferentes temperaturas na qual a primeira delas ocorre à temperatura ambiente e a outra à temperaturas que variam de 70 a 110°C.

[019] O documento US 5,041,292 descreve microsferas transportadoras de fármaco que compreende um polissacarídeo ou um mucopolissacarídeo aderido à molécula de proteína por ligação cruzada. Numa construção preferencial desta invenção, a proteína é escolhida do grupo que compreende a albumina, caseína, fibrinogênio dentre outras possíveis e a ligação cruzada é obtida após a adição de um agente formador de ligações amida e/ou um agente tendo pelo menos dois grupos aldeído. Pela descrição deste documento, qualquer fármaco pode ser incorporado nesta partícula.

[020] A partícula proposta na presente invenção difere da partícula descrita neste documento por não apresentar um polissacarídeo ou um mucopolissacarídeo aderido à molécula de proteína.

[021] O documento US 2002/0142046 revela uma nanopartícula de albumina cujo método de obtenção compreende o preparo de uma solução contendo a albumina, um agente estabilizante e um álcool. Especificamente, o agente estabilizante proposto neste documento pode ser um agente oxidante, um agente redutor, polímeros de alto peso molecular, aceptores de hidrogênio, e compostos de enxofre contendo anéis.

[022] A partícula descrita na presente invenção difere da partícula descrita neste documento por não compreender agentes estabilizantes nem álcool.

[023] O documento US 2007/0149496 revela uma composição compreendendo um material antimicrobiano ligado covalentemente a um material magnético de forma a aumentar a sua solubilidade. A composição deste documento apresenta nanopartículas contendo metais com propriedades magnéticas tais como cobalto, cério, samário dentre outros e que possuem diâmetro médio inferior a 100nm.

[024] As partículas da presente invenção diferem das partículas descritas neste documento por não apresentarem os materiais magnéticos descritos e pelo fato do fármaco não realizar nenhuma ligação covalente com o material da partícula.

[025] O documento US 2004/0127895 revela um método de tratamento de tecidos e células que compreende a administração de um composto com propriedades eletromagnéticas e a posterior irradiação da célula ou tecido com radiação eletromagnética. Especificamente, esta composição ao ser irradiada gera uma grande quantidade de calor que causa o efeito terapêutico na célula ou tecido.

[026] A composição da presente invenção difere deste documento por não depender de calor para que o efeito terapêutico na célula ou tecido seja atingido.

[027] O documento WO 2007/085804 revela uma nanopartícula capaz de liberar um fármaco quimicamente ligado ao carreador quando da incidência de luz.

[028] A partícula revelada na presente invenção difere por não apresentar o fármaco ligado quimicamente à nanopartícula.

[029] O documento WO 2007/023398 revela um complexo que compreende um composto fotossensível e um polímero biocompatível e/ou biodegradável destinado ao tratamento de doenças humanas. Especificamente nesta partícula, o polímero biocompatível é ligado covalentemente a um composto que é ativado por enzimas para aumentar a atividade do composto fotossensível.

[030] A partícula da presente invenção, difere da partícula descrita neste documento por não apresentar um composto ligado covalentemente ao polímero biodegradável.

[031] O documento WO 2006/133271 revela uma nanopartícula para uso na terapia fotodinâmica que compreende um composto fotossensível e uma cobertura de polímero que compreende aptâmeros anexados. O composto fotossensível é escolhido do grupo que compreende as porfirinas, as fenotiazinas, as fenoloxazinas ou corantes fotoativos como as ftalocianinas. O polímero é escolhido do grupo que compreende polímeros tais como a caseína, a gelatina, o quitosan dentre outros. O aptâmero inclui entre 10 e 100 nucleotídeos.

[032] A partícula da presente invenção difere da partícula descrita neste documento por não apresentar aptâmeros anexados ao polímero.

[033] Portanto, pode-se ver que não foi encontrado nenhum documento que descreva o método de obtenção de uma nanopartícula de um polímero biodegradável compreendendo um fármaco em seu interior como proposto na presente invenção, sendo a presente invenção nova e inventiva.

### **Objeto da Invenção**

[034] É objeto da presente invenção uma nanopartícula biodegradável utilizada em sistemas de entrega de fármacos que compreende:

- a) pelo menos uma macromolécula biodegradável; e
- b) pelo menos um fármaco.

[035] Especificamente, o princípio ativo do item b) pode ser um princípio ativo ativado por radiação eletromagnética de comprimentos de onda entre 300 e 800 nm, ou outro princípio ativo qualquer, destinado as áreas descritas que atue sem a necessidade da ativação por luz

[036] É ainda um adicional um objeto da presente invenção, composições farmacêuticas compreendendo:

- a) uma nanopartícula compreendendo:
  - pelo menos uma macromolécula biodegradável;
  - pelo menos um fármaco; e
- b) um veículo farmacêuticamente aceitável.

[037] É ainda um objeto adicional da presente invenção o processo de preparo das nanopartículas de macromoléculas biodegradáveis, compreendendo as etapas de:

- a) preparar uma solução compreendendo, pelo menos, uma macromolécula biodegradável e pelo menos um fármaco;
- b) adicionar a solução acima a uma mistura compreendendo pelo menos um óleo e, opcionalmente, pelo menos um surfactante à temperatura ambiente; e
- c) gotejar a emulsão do item b) sob uma mistura aquecida à temperatura adequada compreendendo pelo menos um óleo e, opcionalmente, pelo menos um surfactante; e

d) separar a partícula da mistura oleosa.

[038] Especificamente, o gotejamento do item c) é realizado por qualquer método de gotejamento tais como o gotejamento por um conta-gotas, o gotejamento por uma bomba de infusão com controle de tempo de adição. Especificamente na presente invenção, o gotejamento é feito a uma velocidade de 6 a 10 gotas por minuto.

[039] É um objeto adicional da presente invenção um método para entrega de fármacos compreendendo as etapas de contactar uma célula com uma composição compreendendo uma nanopartícula biodegradável que compreende:

- a) pelo menos uma macromolécula biodegradável; e
- b) pelo menos um fármaco.

[040] Em uma realização preferencial, o método de entrega compreende adicionalmente uma etapa de irradiação da célula com radiação eletromagnética de comprimentos de onda entre 300 nm e 800 nm.

[041] Os versados na arte saberão valorizar os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

#### **Breve Descrição da Figuras**

[042] A Figura 1 mostra a microscopia eletrônica de varredura para as nanopartículas de albumina incorporadas com um fármaco fotossensível derivado das ftalocianinas (NzPC).

[043] A Figura 2 mostra o espectro de fluorescência normalizado de um fármaco fotossensível derivado das ftalocianinas (NzPC) em tampão (T em vermelho) e incorporado as nanopartículas (N em azul).

[044] A Figura 3 mostra a análise da biodegradação por espectro de emissão de fluorescência de um fármaco fotossensível derivado das ftalocianinas (NzPC) incorporada nas nanopartículas de BSA, onde: (0) 0 horas; (1) 2 horas; (2) 12 horas; (3) 24 horas; (4) 48 horas; (5) 60 horas; (6) 72 horas; (7) 120 horas.

[045] A Figura 4A e 4B mostra o perfil de decaimento de fluorescência das nanopartículas de BSA contendo um fármaco fotossensível derivado das ftalocianinas (NzPC).

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[046] A presente invenção é concretizada pelos métodos e exemplos descritos a seguir. Os exemplos a seguir descritos não têm a intenção de limitar a invenção, mas somente de exemplificar algumas das maneiras de concretizá-la.

[047] Para efeitos dessa invenção as expressões “fármaco”, “agente terapêutico”, “droga”, princípio ativo e equivalentes são intercambiáveis.

### **Macromolécula Biodegradável**

[048] Para efeitos dessa invenção a expressão “macromolécula biodegradável” compreende proteínas, peptídeos ou sequências e fragmentos de peptídeos e/ou polímeros biodegradáveis que sofrem alteração na sua estrutura tridimensional durante o preparo da partícula, causando o aprisionamento do fármaco em seu interior.

[049] Como métodos de alteração de estrutura podem ser utilizados métodos físicos como, por exemplo, variação de temperatura, e métodos químicos como, agentes formadores de ligações cruzadas, dentre outros possíveis bem como a mistura dos mesmos.

[050] Além disso, após a entrada na célula, esta macromolécula biodegradável é degradada por ação enzimática liberando o fármaco no interior da célula.

[051] As proteínas úteis na realização da presente invenção são escolhidas do grupo que compreende, sem contudo, limitar, proteínas tais como albumina, colágeno, caseína, queratina, hemoglobina, proteoglicanas, fibrina, dentre outras possíveis.

[052] A presente invenção baseia-se na utilização de proteínas, especialmente a albumina sérica natural (soro albumina bovina, BSA, ou soro

albumina humana), para a preparação de partículas proteicas como sistema de liberação controlada de fármacos ativos em processos fotodinâmicos e outros ativos aplicados na oftalmologia, neurologia, ortopedia, odontologia e oncologia em geral. A escolha desta proteína para o desenvolvimento de SED baseia-se no fato de possuir muitas características desejáveis, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, facilidade de preparação em grande escala e capacidade de incorporar uma ampla variedade de fármacos nos seus sítios de ligação.

[053] Os polímeros biodegradáveis úteis na realização da presente invenção são escolhidos do grupo que compreende, sem, contudo limitar, polissacarídeos como o ácido hialurônico, amido, dextran, celulose, derivados de celulose tais como metilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose, ftalato de celulose acetato, succinato celulose acetato, ftalato hidroxipropilmetilcelulose, dentre outros possíveis bem como a mistura dos mesmos.

[054] O uso de proteínas ou polímeros biodegradáveis levam vantagens sobre outros sistemas de liberação uma vez que estes não precisam ser removidos quando o fármaco é completamente liberado. O fármaco e a proteína e/ou o polímero podem ser combinados de inúmeras formas, dependendo da aplicação de interesse.

[055] A presente invenção utiliza uma macromolécula biodegradável, que está em uma solução aquosa cuja concentração pode variar de 50 a 300 mg/mL. Especificamente, a presente invenção utiliza uma solução de albumina a 250mg/mL.

### Fármaco

[056] O fármaco utilizado na presente invenção pode ser qualquer composto com atividade terapêutica, tais como compostos para terapia fotodinâmica, anti-inflamatórios, analgésicos, antihistamínicos, antibióticos, antifúngicos, antimaláricos, antiprotozoários, antivirais, agentes cardiovasculares, antiarrítmicos, antihipertensivos, vasodilatadores,

antilipidêmicos, diuréticos, antiulcerogênicos, hormônios, imunossuppressores, vitaminas, antidepressivos, antipsicóticos, cicatrizantes, anti-tumorais, dentre outros possíveis bem como a mistura dos mesmos.

[057] Os agentes fotossensíveis úteis da presente invenção incluem, mas não se limitam a qualquer composto, biológico ou não, capaz de absorver radiação na faixa de 300 nm a 800 nm dentro do espectro eletromagnético. Como exemplos, podemos citar fármacos, como porfirinas naturais e/ou sintéticas e seus derivados, ftalocianinas e seus derivados, clorinas e seus derivados, bacterioclorinas e seus derivados, hipericinas, xantenos, fenotiazinas, clorofilas e seus derivados.

[058] Adicionalmente, peptídeos e fragmentos de peptídeos, proteínas recombinantes, fatores de crescimento podem ser também utilizados na presente invenção.

[059] O agente terapêutico utilizado na presente invenção está presente em solução aquosa cuja concentração pode variar de 0,01mM a 10 mM. Especificamente, na presente invenção o agente terapêutico utilizado é o silício-ftalocianina utilizado na terapia fotodinâmica que é utilizado a 0,2 mM.

### Óleo

[060] O óleo utilizado na presente invenção é considerado como qualquer substância líquida que seja imiscível com a solução da macromolécula biodegradável tal como um óleo escolhido do grupo que compreende os óleos minerais, tais como os óleos minerais de base parafínica, os óleos minerais de base naftênica, dentre outros possíveis e os óleos vegetais tais como o óleo de milho, óleo de côco, óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de mamona, óleo de soja, óleo de canola dentre outros possíveis bem como a mistura dos mesmos.

[061] Especificamente, na presente invenção utiliza-se óleo de girassol.

### Agente Surfactante

[062] O agente surfactante útil na presente invenção é escolhido do grupo que compreende o grupo dos surfactantes aniônicos, surfactantes não-iônicos,

surfactantes catiônicos, os surfactantes anfotéricos/zwitterionicos conhecidos do estado da técnica, dentre outros possíveis bem como a mistura dos mesmos.

[063] Especificamente o agente surfactante da presente invenção é utilizado em concentrações que variam de 0,1 a 10% em massa.

[064] Especificamente, a presente invenção utiliza o surfactante span 80, a 1% em massa.

#### Processo de Preparo das Nanopartículas

[065] O processo de preparo das nanopartículas de macromoléculas biodegradáveis compreende as etapas de:

a) preparar uma solução compreendendo, pelo menos, uma macromolécula biodegradável e pelo menos um fármaco;

b) adicionar a solução acima a uma mistura compreendendo pelo menos um óleo e, opcionalmente, pelo menos um surfactante à temperatura ambiente; e

c) gotear a emulsão do item b) sob uma mistura aquecida à temperatura adequada compreendendo pelo menos um óleo e, opcionalmente, pelo menos um surfactante; e

d) separar a partícula da mistura oleosa.

[066] Especificamente, o gotejamento do item c) é realizado por qualquer método de gotejamento tais como o gotejamento por um conta-gotas, o gotejamento por uma bomba de infusão com controle de tempo de adição. Especificamente na presente invenção, o gotejamento é feito a uma velocidade de 6 a 10 gotas por minuto. A temperatura da mistura em c) está compreendida em uma faixa de 40°C a 100°C, preferencialmente 70°C.

[067] As partículas de albumina, obtidas através do método da desnaturação por calor, seriam partículas de natureza levemente hidrofóbica. A hidrofobicidade destas partículas produzidas por técnicas de emulsão em óleo pode ser devido à organização preferencial das moléculas da proteína na interface do óleo vegetal durante a síntese. A desnaturação térmica poderia aumentar esse efeito. Há evidências de que as interações hidrofóbicas entre o

óleo vegetal e a proteína resultem na adsorção das moléculas do óleo vegetal na proteína durante a desnaturação ou na formação das ligações cruzadas das partículas. Estes compostos hidrocarbônicos do óleo podem se aderir à albumina mesmo após as lavagens, afetando deste modo a hidrofobicidade das esferas. O processo de desnaturação por calor para a produção das micro e nanopartículas é ainda limitado pela estabilidade do fármaco durante a exposição ao calor.

[068] A modificação da estrutura tridimensional da proteína e/ou do polímero biodegradável é realizada por quaisquer métodos de modificação estrutural tais como métodos físicos e/ou métodos químicos dentre outros possíveis, bem como a mistura dos mesmos. Especificamente, o método de modificação da estrutura tridimensional utilizado na presente invenção é o da desnaturação por uso de calor.

A separação da partícula do item d) inclui etapas como:

- a) lavagem da partícula com solvente orgânico;
- b) remoção da água e do solvente residual

[069] Especificamente a lavagem da partícula com solvente orgânico é realizada com éter. Podem ainda ser utilizados outros solventes orgânicos ou misturas dos mesmo em proporções variáveis.

[070] A remoção de água e do solvente é feita por qualquer método de remoção de água e de solvente já utilizados no estado da técnica. Especificamente, a presente invenção utiliza o método da liofilização como método de remoção de água e solvente.

### Composição Farmacêutica

[071] A presente invenção provê composições farmacêuticas compreendendo:

- a) uma nanopartícula compreendendo:
  - pelo menos uma macromolécula biodegradável;
  - pelo menos um fármaco; e
- b) um veículo farmacêuticamente aceitável.

[072] Para efeitos desta invenção, por “composições farmacêuticas” entende-se toda e qualquer composição que contenha um princípio ativo, com fins profiláticos, paliativos e/ou curativos, atuando de forma a manter e/ou restaurar a homeostase, podendo ser administrada de forma tópica, parenteral, enteral e/ou intratecal.

[073] A expressão “farmaceuticamente aceitável” é empregada aqui para se referir a compostos, materiais, composições, e/ou forma de dosagem que são, dentro do âmbito da medicina, apropriados para uso em contato com os tecidos de humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, proporcional com uma relação razoável de benefício/risco.

[074] A composição da presente invenção pode ser administrada em forma de dosagem oral, como tabletes, cápsulas (cada qual inclui a liberação sustentada ou formulações com tempo de liberação) pílulas, pós, granulados, elixires, tinturas, suspensões, xaropes, e emulsões. Eles podem também ser administrados em intravenosos (infusão), intraperitoneal, subcutânea, ou em formas intramusculares, todas utilizando dosagens conhecidas para aqueles com habilidade ordinária que praticam a arte farmacêutica. Eles podem ser administrados sozinhos, mas geralmente serão administrados com um veículo farmacêutico selecionado na base de rota de administração escolhida e da prática farmacêutica padrão.

#### Método de Entrega de Fármacos

[075] O método para entrega de fármacos compreende a etapa de contactar uma célula com uma composição compreendendo uma nanopartícula biodegradável que compreende:

- a) pelo menos uma macromolécula biodegradável; e
- b) pelo menos um fármaco.

[076] Em uma realização preferencial, o método de entrega compreende adicionalmente uma etapa de irradiação da célula com radiação eletromagnética de comprimentos de onda entre 300 nm e 800 nm.

[077] As células adequadas para o presente método incluem células de plantas e animais, incluindo, sem contudo, limitar a homem, gato, cão, bovinos, equinos, suínos, caprinos.

**Exemplo 1. Preparação das Nanopartículas de albumina baseado no método da desnaturação por calor.**

[078] A preparação das nanopartículas através do método da desnaturação por calor envolve a formação de ligações cruzadas em uma suspensão, com a formação inicial de pequenas gotas de albumina aquosa em um líquido imiscível em água (fase oleosa), solidificação destas gotas através da formação de ligações cruzadas covalentes e o isolamento das partículas formadas. O fármaco a ser encapsulado é dissolvido ou disperso na solução inicial de albumina.

*Exemplo 1.1 Preparo da solução de BSA*

[079] Sob agitação constante dissolve-se 250mg de BSA em 1mL de água destilada e a esta solução é acrescentado 250µL do agente fotossensibilizador (FS) de concentração estoque de 1mM por 60 minutos.

*Exemplo 1.2 Preparo da fase oleosa*

[080] Em um balão de fundo redondo de 100 mL contendo 30mL de óleo de girassol e 300µL Span 80 adiciona-se a solução de BSA, opcionalmente compreendendo o fármaco FS, com agitação constante pelo sistema ultra turrax (22000 rpm).

[081] Em outro balão de fundo redondo de 100 mL, contendo 70mL de óleo de girassol e 700µL Span 80 pré-aquecido a 70 °C, adiciona-se a emulsão resultante acima por gotejamento com agitação constante por 30 minutos. Ao término da adição mantém-se o aquecimento e a agitação no sistema ultra turrax (22000 rpm) por aproximadamente 10 min.

*Exemplo 1.3. Lavagem das partículas*

[082] Após o resfriamento da solução em temperatura ambiente com agitação magnética, as nanopartículas foram centrifugadas para separação do

óleo e em seguida lavadas com solvente orgânico (éter etílico) por 3 vezes, e então, elas foram dessecadas para retirada do solvente residual e liofilizadas.

### **Exemplo 2. Caracterização das nanopartículas de BSA incorporadas com o agente fotossensível NzPc**

[083] As nanopartículas preparadas pelo método da desnaturação térmica foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de avaliar a morfologia das partículas obtidas. As amostras foram cobertas com Au usando LEO-440 com filamento de tungsten. A Figura 1 mostra que as partículas são esféricas e apresentam organização homogênea com diâmetro médio de 320 nm.

### **Exemplo 3. Estudo espectroscópico de agentes fotossensibilizadores incorporados em nanopartículas de albumina sérica**

[084] A investigação das propriedades espectroscópicas no estado estacionário da Silício-Ftalocianina (NzPc) foi baseada em medidas diretas dos espectros de emissão de fluorescência.

[085] O espectro de emissão de fluorescência fotoestacionária, foi registrado na faixa de 640 a 780 nm, com excitação fixa em 612 nm (Figura 2), com máximo de emissão em 690 nm em meio homogêneo (tampão fosfato) e em 694 nm quando incorporado nas nanopartículas poliméricas.

[086] Os espectros de emissão foram coletados utilizando-se um conjunto de fendas de emissão e excitação com ajustes de 10 nm, 20 nm e 10 nm respectivamente.

[087] A emissão de fluorescência do agente fotossensibilizador é um parâmetro fundamental nas determinações da ação fotodinâmica deste, uma vez que um fotossensibilizador eficiente deve apresentar um tempo de vida singlete pequeno (da ordem de 100 ps a 10 ns).

[088] Além disso, as propriedades fluorescentes do fotossensibilizador são úteis para a visualização, localização e delimitação da lesão maligna.

**Exemplo 4. Determinação do tempo de biodegradação do fotossensibilizador incorporado em nanopartículas de BSA em meio biológico.**

[089] As medidas de biodegradação foram realizadas em plasma humano adotado como modelo de sistema biológico. O plasma humano utilizado nestes ensaios foi cedido pelo Hemocentro da Universidade de São Paulo, de Ribeirão Preto, sendo o mesmo extraído de pacientes saudáveis. A liberação do fármaco incorporado nas partículas de albumina foi acompanhada durante 120 horas. As soluções para estudo foram mantidas sob agitação constante e temperatura controlada (37°C) para mimetizar o ambiente do sistema biológico. As medidas de fluorescência no estado estacionário foram feitas em intervalos de 12 horas.

[090] As amostras foram excitadas em comprimento de onda fixo de (612 nm), o qual corresponde ao máximo de emissão de fluorescência do fármaco NzPC, com conjunto de fendas em 5nm.

[091] O máximo para a liberação do fármaco ocorreu em 2 horas no sistema BSA/NzPc (Figura 3). Após esse período, a intensidade de fluorescência começa a diminuir progressivamente, sendo um indicativo de que o fármaco que estava encapsulado foi liberado da matriz polimérica.

**Exemplo 5. Medidas de fluorescência resolvida no tempo para o fotossensibilizador incorporado em nanopartículas de BSA**

[092] O tempo de vida de fluorescência de uma substância representa o tempo médio que esta molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Os parâmetros que caracterizam os decaimentos resolvidos no tempo podem ser obtidos no domínio do tempo ou no domínio da frequência. As medidas de fluorescência resolvida no tempo podem revelar detalhes referentes às interações do fluoróforo com o meio onde se encontra.

[093] O método utilizado foi o de contagem múltipla de fótons, no qual a amostra é excitada por um flash de luz, e em seguida, um sistema de detecção mede o tempo entre o pulso e a chegada do primeiro fóton. Cada fóton que chega

ao fotodetector é contabilizado de modo que a intensidade emitida decresça em função do tempo.

[094] A contagem de emissão de fóton em função do tempo tem o histograma nas figuras 4 e 5, no qual foram determinados os tempos de vida de fluorescência para as amostras de NzPc em tampão pH 7,4 (meio homogêneo) e quando incorporada as partículas de BSA (meio heterogêneo) juntamente com os seus respectivos resíduos

[095] Os parâmetros cinéticos obtidos a partir dos decaimentos para cada sistema encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1:** Tempos de vida de fluorescência ( $\tau_f$ ) e Amplitude relativa (A) (proporção de cada componente) para o fotossensibilizador NzPc em tampão fosfato pH 7,4 e associado as nanopartículas de BSA.

|                     | $T_1$ (ns)       | $A_1$<br>(%) | $\tau_2$ (ns) | $A_2$<br>(%) | $\tau_3$ (ns)    | $A_3$<br>(%) |
|---------------------|------------------|--------------|---------------|--------------|------------------|--------------|
| <b>NzPc /tampão</b> | 6,16 ±<br>0,0041 | 100          | ----          | ----         | ----             | ----         |
| <b>NzPc/BSA</b>     | 5,19 ±<br>0,0272 | 63,9         | 1,99 ± 0,037  | 31,9         | 0,319 ±<br>0,014 | 4,2          |

[096] O decaimento de fluorescência da NzPc em meio homogêneo (tampão fosfato pH 7,4) foi monoexponencial. A incorporação do fotossensibilizador ao sistema de liberação difere de uma cinética tipicamente monoexponencial para um decaimento triexponencial.

[097] Assim, o método de análise empregado indica uma cinética de decaimento complexo, o que reflete a natureza micro-heterogênea do sistema nanoparticulado. Em sistemas micro-heterogêneos o decaimento de fluorescência é quase sempre multi-exponencial devido á heterogeneidade do ambiente, então, a população de NzPc incorporada nas partículas de BSA é heterogênea, estando localizada em diferentes ambientes por adsorção sobre a superfície da partícula ou por inclusão na matriz.

## REIVINDICAÇÕES

1. NANOPARTÍCULA TRANSPORTADORA DE FÁRMACOS PARA TERAPIA FOTODINÂMICA **caracterizada por** compreender albumina como macromolécula biodegradável e ftalocianinas e seus derivados como fármaco (ativo).

2. NANOPARTÍCULA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** ativo para terapia fotodinâmica ser silício-ftalocianina.

3. NANOPARTÍCULA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** macromolécula biodegradável ser alvo da ação de enzimas intracelulares.

4. PROCESSO DE PREPARO DE NANOPARTÍCULA DE ALBUMINA E FÁRMACOS, conforme definida nas reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** compreender as etapas de:

a) sob agitação constante, misturar uma solução aquosa de albumina na concentração de 50 a 300 mg/mL a ftalocianinas e seus derivados (ativo) em uma concentração de 0,01 a 10mM, por 60 minutos;

b) preparar uma emulsão água/óleo (w/o) com adição da solução obtida na etapa anterior a uma mistura compreendendo um óleo imiscível à macromolécula biodegradável e, opcionalmente, um surfactante na concentração de 0,1 a 10% em massa, à temperatura ambiente e sob agitação constante;

c) gotejar a emulsão (w/o) obtida na etapa b) a uma mistura oleosa aquecida entre 40 a 100 °C, compreendendo um óleo imiscível à macromolécula biodegradável e, opcionalmente um surfactante na concentração de 0,1 a 10% em massa;

d) separar a partícula obtida da mistura oleosa, segundo as subetapas de:

d1. lavagem da partícula com solvente orgânico e

d2. remoção da água e solvente residual.

5. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pela** concentração da macromolécula biodegradável ser de 250mg/mL.

6. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** ativo ser silício-ftalocianina.

7. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pela** concentração do ativo ser de 0,2 mM.

8. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** óleo ser escolhido do grupo que compreende óleos minerais de base parafínica, os óleos minerais de base naftênica, óleo de milho, óleo de coco, óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de mamona, óleo de soja, óleo de canola e mistura dos mesmos.

9. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** óleo ser de girassol.

10. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** surfactante ser escolhido do grupo que compreende surfactantes aniônicos, não-iônicos, catiônicos, anfotéricos e mistura dos mesmos.

11. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** surfactante ser não iônico a 1% em massa.

12. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** gotejamento da emulsão na etapa c) ser feito a uma velocidade de 6 a 10 gotas por minuto.

13. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pela** temperatura da mistura da etapa c) ser de 70°C.

14. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de o solvente orgânico utilizado para a lavagem da partícula ser éter.

15. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de a remoção de água e solvente na etapa d) ser realizado por métodos conhecidos do estado da técnica.

16. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pela** remoção de resíduos de água e de solvente orgânico ser realizada por liofilização.

FIGURAS

Figura 1

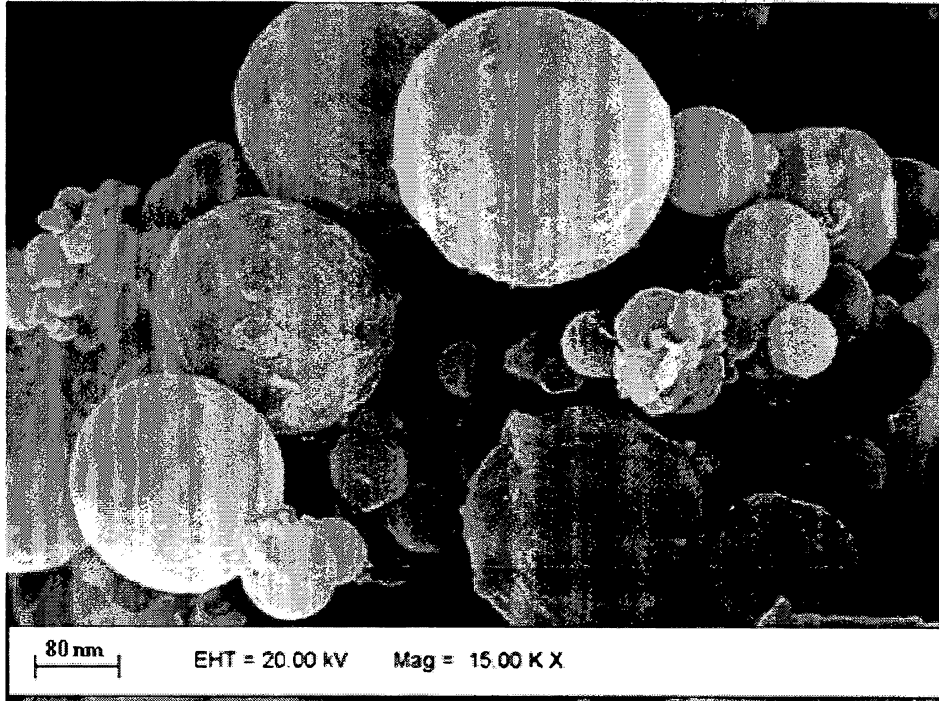


Figura 2

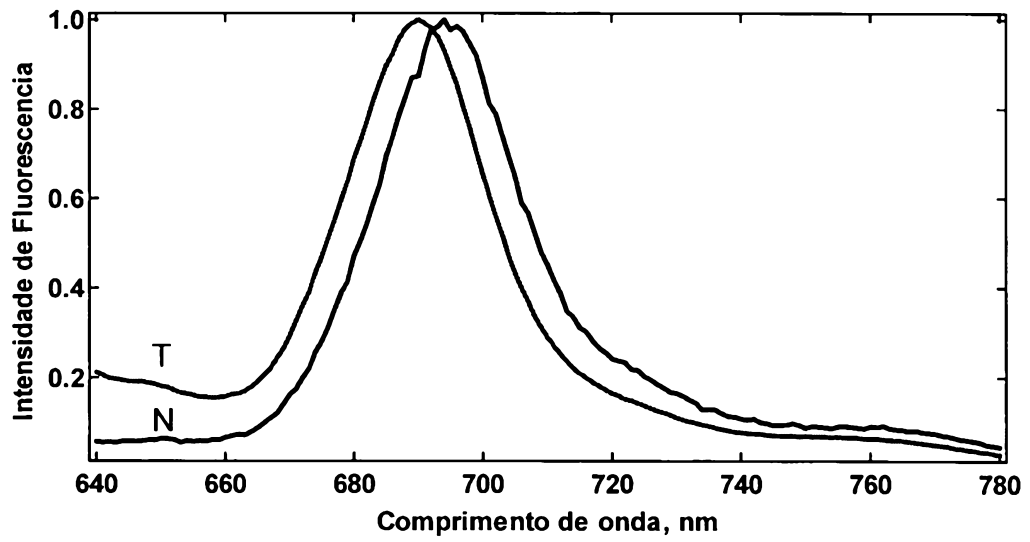


Figura 3

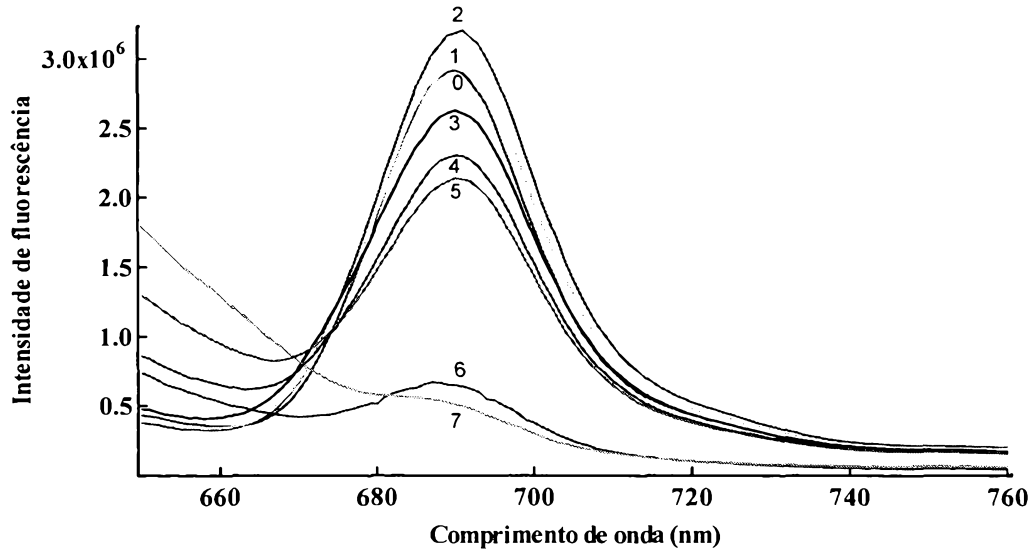


Figura 4A

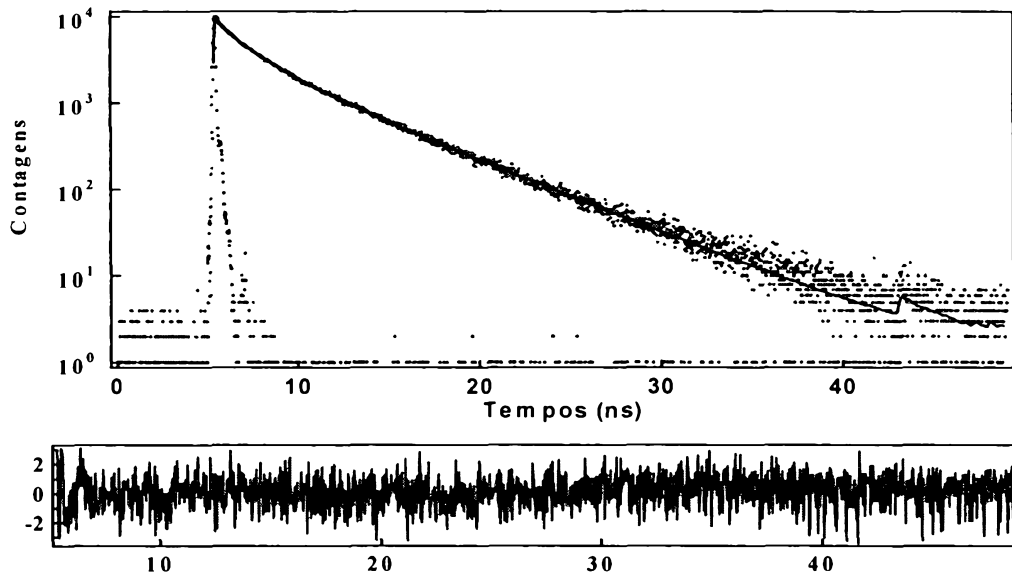


Figura 4B