



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

(11) PI 0604577-4 B1



(22) Data do Depósito: 31/08/2006

(45) Data de Concessão: 24/11/2020

(54) Título: FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA PARA ADMINISTRAÇÃO INTRAOCULAR DE FÁRMACOS E PROCESSO DE OBTENÇÃO

(51) Int.Cl.: A61K 9/00; A61K 9/22; A61K 31/573; A61K 47/30.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

(72) Inventor(es): ARMANDO DA SOLVA CUNHA JUNIOR; RUBENS CAMARGO SIQUEIRA; SILVIA LIGÓRIO FIALHO.

(57) Resumo: Processo de extração de alcalóides indólicos e frações alcalóidicas utilizando fluidos supercríticos. A presente invenção relata o processo de extração de alcalóides indólicos e frações alcalóidicas utilizando fluidos supercríticos e parâmetros diferenciados que aumentam eficiência da extração, obtendo fluidos mais ricos e mais puros. Esta invenção apresenta a otimização do processo de extração supercrítica de alcalóides indólicos pelo ajuste das condições de temperatura, pressão, teor e tipo de co-solvente para elaboração de alimentos enriquecidos, fitoterápicos e medicamentos. Os alcalóides em questão apresentam importante atividade terapêutica, tais como, atividades anti-tumoral, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, antimicrobiano, anticancerígeno, tripanomicida e leishmanicida. Com o processo aqui apresentado, verifica-se um aumento no rendimento da fração de alcalóides indólicos pelo uso da melhor condição de extração. Apresenta-se também a obtenção dos componentes desejados com mínimos riscos ambientais devido à redução do uso de solventes orgânicos e das etapas de purificação presentes nos processos convencionais.

“FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA PARA ADMINISTRAÇÃO INTRAOCULAR DE FÁRMACOS E PROCESSO DE OBTENÇÃO”

A presente invenção diz respeito a processo de produção de formulação farmacêutica capaz de tratar degenerações retinianas e doenças do segmento posterior do bulbo do olho, tais como retinopatia diabética; degeneração macular ligada à idade; retinite por citomegalovírus; endoftalmite; uveítes. As doenças do segmento posterior do bulbo do olho são responsáveis pela maioria dos casos de cegueira irreversível no mundo inteiro. Este cenário, portanto, estimula o desenvolvimento de novas modalidades de tratamento para degenerações retinianas e outras doenças do segmento posterior do bulbo do olho. O sucesso no tratamento destas doenças visa, essencialmente, o transporte de doses efetivas de fármacos para os tecidos mais internos do olho (Geroski D H, Edelhauser H F. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. Advanced drug delivery reviews, v. 52, p. 37-48, 2001). A dita formulação compreende um sistema monolítico do ativo composta por uma matriz à base de polímero biodegradável da classe dos poli-ésteres. A formulação é aplicável à administração pela via intra-ocular.

O dispositivo biodegradável em questão pode veicular um ou mais fármacos das classes dos corticóides, tais como a dexametasona, a prednisolona e a triancinolona, antiinflamatórios não esteroidais, antibióticos, agentes imunossupressores e agentes antiproliferativos.

As formas farmacêuticas oftálmicas convencionais são relativamente simples: fármacos solúveis em água são formulados na forma de soluções e fármacos pouco solúveis em água são formuladas nas formas de suspensão ou pomada. Entretanto, estas formulações apresentam os inconvenientes de baixa biodisponibilidade corneal, exposição sistêmica devido à drenagem nasolacrimal e reduzida eficácia

no segmento posterior do olho (Ding, S Recent developments in ophthalmic drug delivery. Pharmaceutical science and technology today, v.1, n. 8, p. 328-335, 1998).

Apesar das estruturas externas do olho serem facilmente
5 acessíveis, a fisiologia e a anatomia do olho apresentam características como a impermeabilidade relativa do epitélio corneano, a dinâmica lacrimal, a drenagem nasolacrimal e a eficiente barreira hemato-ocular, que são mecanismos de proteção do olho e que dificultam a penetração de fármacos, promovendo uma baixa biodisponibilidade ocular (Ding, S
10 Recent developments in ophthalmic drug delivery. Pharmaceutical science and technology today, v.1, n. 8, p. 328-335, 1998). Por esses motivos, cerca de apenas 5% da dose administrada é absorvida e atinge os tecidos intra-oculares, enquanto grande parte dessa dose é absorvida sistemicamente (Järvinen, K; Järvinen, T; Urtti A Ocular absorption
15 following topical delivery. Advanced drug delivery reviews, v.16, p. 3-19, 1995). Entretanto, os sítios de ação da maioria dos fármacos utilizadas em oftalmologia estão localizados no interior do olho, mais especificamente, nos tecidos anexos às câmaras anterior e posterior e câmara vítrea (Davies, N M Biopharmaceutical considerations in topical
20 ocular drug delivery. Clinical and experimental pharmacology and physiology, v. 27, p. 558-562, 2000).

A drenagem lacrimal é o principal fator responsável pela perda do fármaco da região pré-corneal, resultando em baixa biodisponibilidade ocular, sendo, também, uma das mais importantes vias de entrada do
25 fármaco na circulação sistêmica (Ding, S Recent developments in ophthalmic drug delivery. Pharmaceutical science and technology today, v.1, n. 8, p. 328-335, 1998).

O tratamento de doenças oculares no vítreo e na retina tem sido um problema devido à dificuldade de acesso a essas estruturas

(Peyman, G A and Ganiban, G J Delivery systems for intraocular routes. Advanced drug delivery reviews, v.16, p. 107-123, 1995). A administração ocular na forma de colírios, embora seja o método mais empregado, resulta em concentrações mais elevadas nos tecidos
5 anteriores (córnea, conjuntiva, esclera, humor aquoso e corpo ciliar) e apresenta efeito terapêutico mínimo na região posterior do olho (lente, vítreo e retina), que, geralmente, é mantido com aplicações freqüentes da formulação (Järvinen, K; Järvinen, T; Urtti A. Ocular absorption following topical delivery. Advanced drug delivery reviews, v.16, p. 3-19,
10 1995). A administração direta no espaço subconjuntival apresenta algumas vantagens sobre a terapia tópica para o tratamento de doenças do segmento anterior do olho, mas não proporciona concentração efetiva do fármaco no segmento posterior.

A via sistêmica pode ser utilizada com essa finalidade, mas se
15 observa baixa penetração no olho em virtude da existência da barreira hematorretiniana, que dificulta a entrada de substâncias da circulação sangüínea para a retina. Para que se obtenha uma concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica utilizando essa via, é necessária a administração de concentrações elevadas durante um período
20 prolongado, podendo ocasionar sérios efeitos adversos (Peyman, G A and Ganiban, G J Delivery systems for intraocular routes. Advanced drug delivery reviews, v.16, p. 107-123, 1995).

A injeção intra-ocular é uma alternativa para a obtenção da concentração adequada de fármacos no vítreo e na retina. Essa via era
25 restrita ao tratamento de endoftalmite e, atualmente, ela tem sido utilizada para casos de vitreorretinopatia proliferativa, retinite viral e uveíte (Peyman, G A and Ganiban, G J Delivery systems for intraocular routes. Advanced drug delivery reviews, v.16, p. 107-123, 1995). Entretanto, a rápida circulação sangüínea nesses locais promove uma

redução da meia-vida dos fármacos nos mesmos, diminuindo, rapidamente, suas concentrações a níveis sub-terapêuticos. Para que os níveis se mantenham dentro da faixa terapêutica, são necessárias, então, injeções repetidas intravítreo, as quais podem causar desconforto para o paciente e ocasionar complicações como hemorragia no vítreo, infecções, catarata e descolamento da retina (Kimura, H and Ogura, Y Biodegradable polymers for ocular drug delivery. *Ophthalmologica*, v. 215, p. 143-155, 2001; 2001; Yasukawa, T; Kimura, H; Tabata, Y; Ogura, Y Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v. 52, p. 25-36, 2001).

Por causa das razões acima descritas, têm sido realizados diversos estudos visando o desenvolvimento de sistemas que sejam capazes de manter a concentração dos fármacos no segmento posterior do olho, dentro da faixa terapêutica, por um período mais prolongado (Colthurst, M J; Williams, R L; Hiscott, P S; Grierson, I. *Biomaterials used in the posterior segment of the eye*. *Biomaterials*, v. 21, p. 649-665, 2000).

A dexametasona e seus derivados são glicocorticóides de ação prolongada, empregados em oftalmologia desde a década de 60 no tratamento de inflamações oculares, devido à sua segurança e à sua potência antiinflamatória (Leopold I H. *Nonsteroidal and steroidal anti-inflammatory agents*. In: Sears M L.; Tarkkanen A. *Surgical pharmacology of the eye*. 1958. New York: Raven Press, p. 83-133; Baeyens V, Kaltsatos V, Boisramé B, Varesio E, Veuthey J L, Fathi M, Balant L P, Gex-Fabry M, Gurny R. *Optimized release of dexamethasone and gentamicin from a soluble ocular insert for the treatment of external ophthalmic infections*. *Journal of controlled release*, v. 52, p. 215-220, 1998).

Os glicocorticóides têm a capacidade de reduzir acentuadamente as manifestações da inflamação, devido aos efeitos profundos que exercem sobre a concentração, distribuição e função dos leucócitos periféricos, e de inibir a atividade da fosfolipase A₂. Eles inibem as

5 funções dos leucócitos e dos macrófagos teciduais, reduzindo a capacidade dessas células de responderem a antígenos e mitógenos, e limitam a capacidade dos macrófagos de fagocitar e destruir microorganismos e produzir interleucina-1, colagenase, elastase, fator de necrose tumoral e ativador do plasminogênio. Além de terem efeito

10 imunossupressor, eles influenciam a resposta inflamatória ao reduzir a síntese de prostaglandinas e leucotrienos decorrente da ativação da fosfolipase A₂, aumentam a concentração de certos fosfolipídios que parecem inibir a síntese de prostaglandinas e leucotrienos, e podem reduzir a expressão da ciclooxygenase, com conseqüente diminuição da

15 quantidade de enzima disponível para formação de prostaglandinas (Schimmer B P, Parker K L. Hormônio adrenocorticotrófico, esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos, inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. In: Hardman J E, Limbird L E. Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica. 1996. São

20 Paulo: McGraw Hill. 9. ed., Cap. 59, p. 1082-1102; Goldfien A. Adrenocorticosteróides e antagonistas cortico-supra-renais. In: Katzung B G. Farmacologia básica e clínica. 1998. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 6. ed., Cap. 38, p. 450-461)

Assim como em outros tecidos, os corticóides parecem não

25 apresentar efeitos específicos no olho, mas exercem um amplo espectro de atividade antiinflamatória. Os principais efeitos dos corticóides nos tecidos oculares sejam eles positivos ou negativos, incluem: a redução da resposta imune celular, a redução da permeabilidade vascular inflamatória, a estabilização da barreira hemato-aquosa, a inibição da

proliferação epitelial, a inibição da neovascularização corneal inflamatória, a redução do tempo de cicatrização, a elevação da pressão intra-ocular e a indução de catarata. (Sherif Z, Pleyer U. Corticosteroids in ophthalmology: past-present-future. *Ophthalmologica*, Basel, v. 216, p. 305-315, 2002).

Atualmente, encontramos disponíveis algumas patentes relacionadas a dispositivos para administração intra-ocular de fármacos.

A patente US 6,001,386 intitulada “Dispositivo implantável de liberação controlada para o transporte de drogas diretamente para a região interna do organismo” descreve um dispositivo simples e implantável de liberação controlada de drogas que apresenta um núcleo contendo uma quantidade efetiva de uma substância de baixa solubilidade e uma membrana polimérica externa não biodegradável permeável à substância veiculada (Ashton P, Pearson P A. Implantable controlled release device to deliver drugs directly to an internal portion of the body. Patent US 6,001,386; 1999). Esta patente descreve, ainda, um método para tratamento de mamíferos por meio da obtenção de efeitos fisiológicos ou farmacológicos locais ou sistêmicos por meio da implantação cirúrgica do dispositivo descrito.

A patente US 6,331,313 intitulada “Dispositivos implantáveis biocompatíveis de liberação controlada para transporte ocular de drogas e métodos” descreve dispositivos biocompatíveis de liberação controlada que podem ser implantados no olho (Wong V G, Hu M W L, Berger D E. Controlled-release biocompatible ocular drug delivery implant devices and methods. Patent US 6,331,313; 2001). Estes dispositivos apresentam um núcleo composto pelo fármaco e uma membrana polimérica impermeável ao meio externo e permeável à liberação do fármaco. Neste sistema, o transporte do fármaco é efetuado através dos orifícios presentes na membrana polimérica, os quais ocupam menos de

10% da área de superfície total do sistema. Estes dispositivos podem ser utilizados para o transporte de vários fármacos com diferentes solubilidade e massa molecular.

5 A patente US 6,251,090 intitulada “Transporte intravítreo de medicamento” descreve um dispositivo na forma de implante, através do qual uma variedade de substâncias com atividade farmacológica pode ser introduzida na cavidade vítrea com apenas uma simples cirurgia inicial para implantação do dispositivo (Avery R L, Luttrull J K. Intravitreal medicine delivery. Patent US 6,251,090; 2001). Este dispositivo e o
10 método de aplicação reduzem a incisão cirúrgica necessária para implantação e evitam futuros e até mesmo repetidos procedimentos cirúrgicos invasivos. Quantidades adicionais do medicamento podem ser rapidamente introduzidas ou a medicação pode até mesmo ser variada ou modificada, conforme necessário. Além disso, o dispositivo e o
15 método de implantação desenvolvidos permitem um controle da dose a ser liberada na cavidade vítrea e também evitam a ocorrência de efeitos adversos com outros tecidos do olho durante o uso ou o procedimento de implantação.

A patente US 6,719,750 intitulada “Dispositivos para transporte
20 intra-ocular de drogas” descreve dispositivos para o transporte de agentes terapêuticos para regiões limitadas do organismo, tais como a câmara posterior do olho e a região interna do ouvido (Varner S E, DeJuan E, Shelley T, Barnes A C, Humayun M. Devices for intraocular drug delivery. Patent US 6,719,750; 2004). Os dispositivos desta
25 invenção são pouco invasivos, podem ser recarregados e facilmente fixados no local de tratamento. Estes sistemas são capazes de transportar uma ou mais substâncias de forma prolongada.

A patente US 6,726,918 intitulada “Métodos para tratamento de condições inflamatórias do olho” descreve métodos para tratamento de

condições inflamatórias do olho por meio da implantação, no vítreo, de um dispositivo biodegradável composto por um antiinflamatório esteroidal e um polímero biodegradável (Wong V G, Hu M W L. Methods for treating inflammation-mediated conditions of the eye. Patent US 6,726,918; 2004). Este implante é capaz de liberar a substância no vítreo em quantidade suficiente para atingir a concentração equivalente a pelo menos 0,05 µg/ml de dexametasona em 48 horas e mantém a concentração equivalente a pelo menos 0,03 µg/ml de dexametasona por cerca de três semanas.

Os implantes são dispositivos preparados a partir de diferentes polímeros, sendo eles biodegradáveis ou não-biodegradáveis. Estes sistemas podem, ainda, ser de dois tipos: matriciais (ou monolíticos) e reservatórios (Dash A K, Cudworth II G C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. Journal of pharmacological and toxicological methods, v. 40, p. 1-12, 1998; Kimura H, Ogura Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. Ophthalmologica, v. 215, p. 143-155, 2001). No sistema matricial, a substância se encontra dispersa na matriz polimérica. A liberação do fármaco, caso se trate de um sistema biodegradável, ocorre por difusão pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos. Quando se utilizam polímeros não-biodegradáveis, a liberação ocorre apenas por um processo de difusão lenta pela matriz. No sistema do tipo reservatório, preparados com polímeros biodegradáveis ou não-biodegradáveis, a substância se encontra em uma cavidade central envolta por uma membrana polimérica, a qual controla sua taxa de liberação. (Dash A K, Cudworth II G C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. Journal of pharmacological and toxicological methods, v. 40, p. 1-12, 1998; Kimura H, Ogura Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. Ophthalmologica, v.

215, p. 143-155, 2001). Como o sistema de liberação de fármacos na forma de implante deve ser biocompatível com o organismo, os componentes nele presentes devem ser não-carcinogênicos, hipoalergênicos, mecanicamente estáveis e não-causadores de resposta inflamatória no local de aplicação. Acrescenta-se, ainda, que as características químicas e físicas do material não devem ser modificadas pelo tecido local (Athanasiou K A, Niederauer G G, Agrawal C M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, v. 17, p. 93-102, 1996).

Implantes preparados a partir de sistemas poliméricos podem ser aplicados em diferentes regiões do olho. Ordenando-se as regiões da mais superficial à mais profunda, temos: região subconjuntival, região subtenoniana, esclera e o interior do bulbo do olho (câmara anterior e corpo vítreo). Em geral quanto mais profunda a região, mais delicado o procedimento e mais eficaz a concentração no vítreo e na retina (Kimura H, Ogura Y. *Biodegradable polymers for ocular drug delivery*. *Ophthalmologica*, v. 215, p. 143-155, 2001; Fialho S L, Rego M G B, Cardillo J A, Siqueira R C, Jorge R, Silva-Cunha A. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, v. 66, p.891-896, 2003).

Implantes não-biodegradáveis de liberação lenta foram aprovados para uso clínico nos Estados Unidos da América (EUA): o Ocusert® (Alza, EUA), um dispositivo conjuntival que libera pilocarpina, o Vitrasert® (Bausch & Lomb, EUA), um implante intravítreo contendo ganciclovir que tem sido usado em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida para o tratamento de retinite por citomegalovírus, e o Retisert® (Bausch & Lomb, EUA), um implante intravítreo contendo fluocinolona indicado para o tratamento de uveíte não infecciosa crônica (U.S. Food and Drug Administration. In: FDA news. Product approvals. Disponível

em: <<http://www.fda.gov/opacom/7approval.html>>. Acesso em: 08 ago 2005). O problema destes implantes é que, como os polímeros não são biodegradáveis, é necessária a remoção do sistema após completa liberação do fármaco ou, caso não sejam removidos, eles permanecem
5 no local, até que sejam retirados por meio de processos cirúrgicos.

Polímeros biodegradáveis naturais e sintéticos estão sendo estudados como componentes em sistemas de liberação de drogas, mas apenas alguns têm demonstrado verdadeira biocompatibilidade. Os naturais, à base de proteínas, como as albuminas bovina e humana, o
10 colágeno e a gelatina, apresentam uso restrito por conterem pureza questionável e, em alguns casos, atividade antigênica marcante. Já os sintéticos, representados por poliamidas, poliaminoácidos, polialquilcianacrilatos, poliésteres, poliortoésteres, poliuretanos e poliacrilamidas, têm apresentado crescente interesse na aplicação como
15 sistemas de liberação de fármacos. Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como a poli(ϵ -caprolactona), o poli(D,L-lático) (PLA) e os copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico (PLGA), sendo que os dois últimos tipos têm sido amplamente empregados (Jain R, Shah N H, Malick A W, Rhodes C T. Controlled
20 drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. Drug development and industrial pharmacy, v. 24, p. 703-727, 1998).

Até o momento o estado da arte não descreve claramente, um sistema biodegradável de implantação intra-ocular que permita a forma
25 de administração prolongada de fármacos, em específico um sal de dexametasona. Uma alternativa para esta formulação consiste no emprego dos implantes na forma de sistemas matriciais ou monolíticos. A presente invenção baseia-se na utilização de um sistema matricial compatível com a aplicação intra-ocular em humanos e animais, podendo

conter diferentes fármacos, em especial o acetato de dexametasona. Para composição do sistema é utilizado, como matriz polimérica, o polímero poli D,L-lático-co-glicólico.

Os polímeros da classe dos poli-ésteres, tais como os derivados dos ácidos lático e glicólico, têm sido estudados desde as décadas de 60 e 70 para a fabricação de fios de sutura. Os resultados mostraram que eles proporcionaram boas propriedades mecânicas, baixa capacidade alergênica, baixa toxicidade, excelente biocompatibilidade e uma cinética previsível de biodegradação, despertando a atenção de vários pesquisadores quanto a suas possíveis aplicações em tecnologia farmacêutica. Estes polímeros obtiveram aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para a utilização como sistemas de liberação de fármacos, existindo diversos estudos demonstrando sua baixa toxicidade (Jain R, Shah N H, Malick A W, Rhodes C T. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. Drug development and industrial pharmacy, v. 24, p. 703-727, 1998).

Os polímeros e copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico são sintetizados por uma reação de condensação, através da abertura do anel dos dímeros cíclicos (ácido lático e/ou ácido glicólico). A polimerização geralmente ocorre por um período de duas a seis horas, sob temperatura em torno de 175° C, utilizando, como catalisador, principalmente, o cloreto estanhoso (Jain R, Shah N H, Malick A W, Rhodes C T. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. Drug development and industrial pharmacy, v. 24, p. 703-727, 1998).

A biodegradação desses polímeros ocorre por erosão, por meio de clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando os ácidos lático e glicólico. Esses ácidos, por serem metabólitos naturais do organismo, são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água

(Athanasίου K A, Niederauer G G, Agrawal C M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, v. 17, p. 93-102, 1996). O papel de atuação das enzimas na biodegradação do PLGA e PLA ainda não se encontra bem definido, embora dados descritos na literatura afirmem que esse processo não implica qualquer atividade enzimática, sendo a hidrólise o único mecanismo envolvido (Jain R A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, v. 21, p. 2475-2490, 2000).

10 A presença do grupo metila (CH_3) no polímero derivado do ácido láctico confere a este uma maior hidrofobicidade quando comparado ao derivado do ácido glicólico (PGA). O PGA, portanto, por ser bastante sensível à hidrólise, não é adequado para a utilização em sistemas de liberação de fármacos. Com relação ao PLGA, quanto maior a proporção
15 de ácido láctico, maior a hidrofobicidade do copolímero, já que absorve menos água, e conseqüentemente, menor será a velocidade de degradação. Além disso, a massa molar e o grau de cristalinidade podem influenciar as propriedades mecânicas, a capacidade de hidrólise e a velocidade de degradação desses polímeros (Lewis D H. Controlled
20 release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin M, Langer R. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. 1990. New York: Marcel Dekker, p. 01-41; Blanco-Prieto M J, Fattal E, Puisieux F, Couvreur P. The multiple emulsion as a common step for the design of polymeric microparticles. In: Grossiord J L, Seiller M. *Multiple emulsions: structure, properties and applications*. 1998. Paris: Éditions de Santé, p.
25 397-435).

A temperatura de transição vítrea (T_g) dos diferentes PLA e PLGA encontra-se acima da fisiológica (37°C) e, nessa condição, eles se apresentam na forma cristalina. Desse modo, a cadeia se apresenta

como uma estrutura relativamente rígida, proporcionando uma força mecânica significativa e permitindo que sejam formulados como sistemas de liberação de fármacos. Essa característica é, também, um fator determinante da velocidade de degradação dos polímeros já que está

5 relacionada ao grau de cristalinidade e à organização das cadeias poliméricas (Jain R, Shah N H, Malick A W, Rhodes C T. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. Drug development and industrial pharmacy, v. 24, p. 703-727, 1998).

10 Os polímeros descritos podem ser utilizados na preparação de implantes, os quais se apresentam, geralmente, na forma de bastão, discos ou membranas. Os métodos de obtenção desses sistemas incluem: a moldagem, a extrusão e a preparação de filmes. Por meio da moldagem, a mistura de pós (contendo o polímero e o fármaco) é

15 colocada em um molde desenvolvido na forma do implante e podem ser utilizados, durante o preparo, aquecimento e pressão. Na extrusão, a mistura de pós é propulsão continuamente pelo equipamento, passando por regiões de alta temperatura e pressão, onde ela é fundida e compactada na forma final do implante. A preparação de filmes pode

20 ser realizada por meio de fusão e pressão da mistura de pós ou por adição da solução. O método de adição da solução é o mais utilizado, e, nele, os componentes são dissolvidos em um solvente apropriado formando uma solução que é, então, lançada sobre uma superfície lisa e não-adesiva. O solvente se evapora, e o filme formado é retirado da

25 superfície (Kimura H, Ogura Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. Ophthalmologica, v. 215, p. 143-155, 2001).

A presente invenção é adicionalmente descrita pelos exemplos a seguir:

Exemplo 1 – Preparo do dispositivo (implante) biodegradável contendo acetato de dexametasona

Para o preparo do implante foram utilizados dois métodos diferentes, compressão e moldagem a quente. Foram pesados cerca de 5 1,4 mg de acetato de dexametasona e 3,6 mg de polímero do tipo PLGA, os quais foram solubilizados em uma mistura de acetonitrila e água destilada (2:1). A solução obtida foi filtrada utilizando filtro estéril de 0,22µm, sob fluxo laminar. Em seguida, a solução filtrada foi liofilizada. A mistura de pós obtida foi, então, utilizada para o preparo do implante 10 pelos dois métodos descritos a seguir.

No método de compressão, a mistura de pós previamente obtida foi adicionada a um sistema à base de aço inoxidável composto por pinos cilíndricos de 1 mm de diâmetro e empregou-se uma prensa hidráulica na pressão de 1 ton/m² para o preparo do implante.

15 No método de moldagem a quente, a mistura de pós previamente obtida foi moldada na forma de bastões utilizando uma placa de Teflon[®] aquecida, sobre uma chapa aquecedora, na temperatura entre 100 e 120°C.

Imediatamente após terem sido desenvolvidos, os implantes 20 compostos por PLGA, preparados pelas técnicas de compressão e moldagem a quente foram comparados. Macroscopicamente, todos os implantes se apresentaram lisos, com aparência similar, e como sistemas monolíticos, nos quais o fármaco se encontrava disperso na matriz polimérica. O peso médio dos implantes comprimidos foi de $4,3 \pm 0,2$ mg 25 e dos implantes moldados foi de $4,7 \pm 0,3$ mg, o diâmetro médio foi de $1,0 \pm 0,1$ mm e o comprimento médio de $4,0 \pm 0,1$ mm para os implantes preparados pelas duas técnicas diferentes. O baixo coeficiente de variação entre os implantes, equivalente a 2,79%, foi indicativo da reprodutibilidade das técnicas.

Exemplo 2: Análises de calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A DSC (calorímetro TA Instruments, model 2910 Modulated DSC, EUA) foi empregada com a finalidade, inicialmente, de se obter informações da mistura de pós preparada no Exemplo 1 com relação: à
5 presença de solvente residual após o processo de liofilização, à estabilidade do polímero e do acetato de dexametasona na temperatura de 100 a 120°C utilizada no preparo dos implantes pelo método de moldagem a quente, e à possibilidade de interações entre o fármaco e o polímero empregado.

10 Para a análise da mistura de pós, utilizaram-se cadinhos de alumínio semi-herméticos, os quais foram selados após a pesagem de uma quantidade de 3 a 5 mg das amostras. A calibração do sistema foi realizada utilizando padrão de índio. O seguinte procedimento de análise foi realizado para todas as amostras, sob atmosfera de nitrogênio:

- 15 1) aquecimento inicial em uma razão de 10°C/minuto de 30°C até 100°C;
- 2) isoterma a 100°C por 5 minutos;
- 3) resfriamento rápido até 20°C;
- 4) novo aquecimento em uma razão de 10°C/minuto de 20°C até
20 250°C.

Finalmente, os implantes desenvolvidos também foram analisados por meio de DSC. Para esta análise, os sistemas foram selados em cadinhos de alumínio e aquecidos de 20 a 250°C, sob atmosfera de nitrogênio, na razão de 10°C/minuto.

25 A presença de resíduos de solventes orgânicos em amostras promove uma redução na temperatura de transição vítrea (T_g) para temperaturas mais baixas (Hatakeyama T, Quinn F X. Applications of thermal analysis. In: Hatakeyama T, Quinn F X. Thermal analysis – fundamentals and applications to polymer science. 1994. London: John

Wiley & Sons Ltd, p. 65-105)

Os resultados de DSC realizado nas misturas de pós polímero-fármaco não mostraram alterações significativas nos valores de T_g , sugerindo a ausência de resíduos de solvente nas amostras após o processo de liofilização.

Quando o PLGA foi misturado com o acetato de dexametasona, observou-se uma pequena redução na cristalinidade relativa do fármaco e a temperatura de fusão do fármaco diminuiu. Considerando-se ainda que a T_g não apresentou alteração significativa para essa mistura, pode-se sugerir que não há evidência de interação físico-química relevante entre o fármaco e o polímero nessa mistura.

Finalmente, as análises realizadas nos implantes finais mostraram que os métodos de preparo, principalmente o método de moldagem a quente, não promoveram efeitos negativos na formulação ao se considerar a estabilidade do fármaco e do polímero. A T_g dos polímeros, a temperatura e a entalpia de fusão do acetato de dexametasona não apresentaram alterações significativas após o processo de preparo.

Exemplo 3: Estudo da morfologia de superfície dos implantes preparados pelos métodos de compressão e moldagem a quente

A morfologia de superfície dos implantes preparados pelos métodos de compressão e de moldagem a quente foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Imediatamente após serem preparados, os implantes foram selecionados, aleatoriamente, por meio de iluminação própria e colocados em dessecador contendo sílica gel com indicador azul por 48 horas. Em seguida, eles foram montados em suportes porta-amostras de alumínio. Os sistemas foram montados por inteiro, sem necessidade de cortes, na posição horizontal, para melhor avaliar o tamanho e também as características da superfície. Eles foram aderidos aos suportes

utilizando fita dupla-face e, imediatamente após, foram colocados novamente em dessecador por, no mínimo 24 horas antes do processo de metalização.

Visando conferir condutividade à superfície dos implantes a serem analisados e a obtenção de melhores imagens, procedeu-se a uma metalização com ouro, sob atmosfera de argônio, durante 1 minuto. Foi utilizado, nesta etapa, o acessório DSV 203 do equipamento BAF 300 da Balzers (EUA). Não foi possível estimar, por meio do equipamento disponível, a espessura da camada de ouro formada.

As amostras foram observadas no microscópio Zeiss DSM 950 (Carl Zeiss NTS GmbH, Alemanha), utilizando a voltagem de 15 kV.

A superfície dos implantes foi visualizada nos aumentos de 300X e 1000X e as imagens foram transferidas para o computador por meio de uma interface digital de transferência de imagens. As imagens obtidas foram ajustadas utilizando os programas Adobe Photoshop versão 6.0 e Adobe Illustrator versão 9.01 (Adobe Systems Incorporated, 2000, EUA).

As fotomicrografias obtidas mostraram que diferenças significativas foram observadas na morfologia de superfície dos implantes preparados pelos dois métodos diferentes. A superfície dos implantes preparados por compressão se apresentou irregular, com presença de poros e canais. Os sistemas preparados por moldagem a quente apresentaram uma superfície mais lisa com pouca evidência de poros e com aparência mais homogênea.

Exemplo 4: Estudo de degradação *in vitro* dos implantes desenvolvidos no Exemplo 1

A degradação *in vitro* dos implantes preparados por compressão e moldagem a quente foi monitorada por meio da medida da porcentagem de perda de massa.

Os implantes de PLGA contendo acetato de dexametasona

preparados por compressão e moldagem a quente (n=4), previamente pesados, foram colocados em recipientes individuais e imersos em 200 ml de solução tampão fosfato (PBS) 0,1M; pH 7,4, sob temperatura constante de 37°C.

5 Em intervalos de tempo pré-determinados, o meio contendo os implantes foi centrifugado e o líquido removido. As amostras restantes foram secadas por 48 horas em um dessecador à vácuo sob temperatura ambiente. Em seguida, o peso seco final foi registrado e a porcentagem de perda de massa foi calculada pela equação: % perda de massa =
10 (peso inicial – peso seco final) / peso inicial.

Os perfis obtidos, típicos deste polímero, mostraram um período inicial no qual não ocorre perda de massa, seguido por uma fase de queda da massa.

O período de latência anterior ao início da perda de massa foi de 2
15 semanas para os implantes comprimidos de PLGA comparado ao período de 4 semanas para os implantes moldados. Os sistemas comprimidos, por se apresentarem como matrizes mais porosas, facilitam a entrada de água e, portanto, este fato contribui para sua degradação mais rápida quando comparado aos sistemas moldados.

20 Como o polímero PLGA degrada por erosão, os implantes preparados com este polímero apresentaram uma fase de latência independente da técnica de preparo utilizada. A fase de latência inicial, típica da degradação de implantes à base de poliésteres, tem sido freqüentemente explicada pela lenta penetração de água nas matrizes
25 hidrofóbicas. A segunda fase pode ser atribuída à hidrólise da cadeia polimérica, a qual ocorre por quebra aleatória (Witt C, Mäder K, Kissel T. The degradation, swelling and erosion properties of biodegradable implants prepared by extrusion or compression molding of poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers. Biomaterials, v. 21, p. 931-

938, 2000).

Exemplo 5: Estudo de liberação *in vitro* dos implantes desenvolvidos no Exemplo 1

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado em 200 ml de solução
5 tampão fosfato 0,1M; pH 7,4, sob condições *sink*. Este estudo foi realizado no banho-maria BD R02020 (Lauda, Alemanha) equipado com placa agitadora, sob temperatura constante de 37°C.

Quatro implantes de cada um dos implantes previamente pesados de PLGA preparados por compressão e moldagem a quente foram
10 colocados em pequenos frascos de polipropileno abertos de modo que permitisse a entrada do meio e que não causasse grandes movimentos dos implantes no meio de liberação. Os pequenos frascos foram colocados em recipientes âmbar individuais e fechados. Este procedimento foi feito visando aproximar o estudo das condições
15 encontradas *in vivo*, em que os implantes não se movimentam no meio ocular.

Em intervalos de tempo pré-determinados, 2,0 ml do meio de liberação foram coletados e 2,0 ml de um novo meio, com a mesma constituição anterior, foi adicionado a cada recipiente.

20 A quantidade de acetato de dexametasona liberada no meio foi medida por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o método descrito no Exemplo 6.

Os perfis de liberação *in vitro* obtidos para os implantes desenvolvidos mostraram que o acetato de dexametasona foi liberado
25 lentamente. No início, provavelmente, o fármaco depositado na superfície e nos canais aquosos da matriz foi liberado. Em seguida, um estágio de liberação lenta do fármaco foi observado, e atribui-se à difusão pelos poros iniciais já presentes nas matrizes e pelos novos canais formados durante o processo de degradação do polímero.

Após 4 semanas, os sistemas preparados com PLGA apresentaram modificações na estrutura inicial e redução de força. Neste momento, os implantes mostraram um pico de liberação devido à difusão do fármaco através do crescente número de poros e canais formados na matriz durante sua degradação para o meio de liberação.

A comparação entre os implantes preparados por métodos diferentes mostrou que os implantes comprimidos promoveram uma liberação mais rápida do acetato de dexametasona que os implantes moldados. Isto pode ser atribuído à maior entrada de água nos sistemas preparados por compressão, já que eles apresentaram um maior número de poros e canais, resultando no aumento da liberação do fármaco.

Análises estatísticas utilizando o teste *t* não-pareado, empregando o programa GraphPad Prism®, versão 3.00 (GraphPad Software Incorporated, 1994-1999) mostraram que a liberação *in vitro* do acetato de dexametasona a partir dos implantes preparados com PLGA por métodos diferentes foi significativamente diferente para $P < 0,05$.

Os implantes comprimidos e moldados apresentaram, respectivamente, uma porcentagem de liberação máxima de 93% e 76% em 25 semanas.

Exemplo 6: Método de cromatografia líquida de alta eficiência para análise de acetato de dexametasona

O método empregado para análise do acetato de dexametasona foi o descrito na Farmacopéia Americana 24 (The United States Pharmacopeia 24 ed. - NF 19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc., 2000. CD-ROM - Insight Publishing Productivity).

Foi utilizado o equipamento Waters® composto por um autoinjeter modelo 717plus (Waters, USA). Uma bomba (modelo 515, Waters, USA) foi empregada no fluxo constante de 1,2 ml/minuto. Uma coluna do tipo C-18 de fase reversa, de tamanho 3,9 mm x 150 mm, com partículas de

5µm foi utilizada. A fase móvel era composta por uma mistura de acetonitrila e água ultrafiltrada na proporção de 45:55. O detector de ultravioleta (modelo 2487, Waters, USA) foi utilizado no comprimento de onda de 254 nm.

- 5 Após avaliação da presença de interferentes da solução tampão fosfato, presente no estudo de liberação, e do polímero empregado para o preparo dos implantes, na análise cromatográfica do acetato de dexametasona, foi observada ausência de absorção, no mesmo tempo de retenção do padrão do fármaco, de picos nos cromatogramas
10 provenientes da solução tampão e do polímero.

Exemplo 7: Estudo de liberação *in vivo* dos dispositivos desenvolvidos por moldagem a quente no Exemplo 1

- Os implantes empregados neste estudo foram os preparados pelo método de moldagem a quente, de acordo com a técnica descrita no
15 Exemplo 1.

- Foram utilizados sessenta coelhos machos, da raça *New Zealand*, com idade média de 4 meses e pesando entre 2,0 e 2,5 Kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura média de 25°C, com ar condicionado e exaustor de ar, e luminosidade
20 variando de acordo com a luz solar. Não houve restrição de água e a alimentação utilizada foi ração animal própria para a espécie. Os animais foram divididos em dois grupos. No grupo 1, os sistemas contendo acetato de dexametasona desenvolvidos foram implantados cirurgicamente no corpo vítreo do olho direito de 38 coelhos. E no grupo
25 2, o qual serviu como controle, 22 coelhos receberam os implantes sem o fármaco. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) para o uso de animais em pesquisa em oftalmologia. Este estudo foi, ainda, aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da

Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP).

5 Para implantação dos sistemas, foram necessários procedimentos cirúrgicos. Os coelhos foram anestesiados com injeção intramuscular de uma mistura de cloridrato de cetamina (30 mg/kg, Ketamin® 50 mg/ml, Cristália, Brasil) e cloridrato de xilasina (4,0 mg/kg, Coopazine® 2,0 g/100ml, Schering-Plough Coopers, Brasil), com doses adicionais de
10 cloridrato de cetamina caso necessário. No procedimento cirúrgico, uma peritomia de 5 mm no quadrante temporal superior e uma esclerotomia a 2 mm do limbo foram realizadas no olho direito, pela qual o implante foi inserido e posicionado sem suturas. A esclera e a conjuntiva foram suturadas com fio absorvível (Vicryl® 7.0, Johnson & Johnson, Brazil).

15 Quatro animais do grupo 1 e dois do grupo 2 foram sacrificados, por semana, com dose letal de pentobarbital 100 mg/kg após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 semanas de implantação dos sistemas desenvolvidos. O olho direito dos animais foi imediatamente enucleado; o corpo vítreo dos 32 animais do grupo 1 e dos 16 animais do grupo 2 foi completamente
20 removido e imediatamente colocado em freezer a -80°C até ser feita a análise da concentração do fármaco. Os sistemas implantados também foram removidos dos olhos dos animais e utilizados em outras etapas.

 A quantidade de acetato de dexametasona liberada no corpo vítreo dos animais que receberam os implantes desenvolvidos foi determinada
25 pelo método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando o método descrito no Exemplo 8.

 Os valores encontrados no estudo de liberação *in vivo* são consistentes com um perfil de liberação trifásico: um pequeno pico, um segundo estágio provocado pela difusão do fármaco antes do início da

erosão polimérica, e um pico final causado pela desintegração da matriz polimérica. Os níveis do acetato de dexametasona começaram a reduzir a partir da sétima semana. Nos animais do grupo 2, nos quais foi colocado o implante sem o fármaco, não foi detectada a presença de acetato de dexametasona no corpo vítreo.

O perfil de liberação *in vitro* obtido a partir destes implantes, previamente descrito no Exemplo 5, foi similar ao encontrado no estudo *in vivo*. Inicialmente, um estágio de liberação lenta do fármaco foi observado, e pode ser atribuído à sua difusão através dos poros iniciais presentes nas matrizes poliméricas e dos novos canais formados durante o processo de degradação. Um pico de liberação observado após 4 semanas em ambos os estudos, *in vitro* e *in vivo*, deve-se, provavelmente, à difusão do fármaco pelo crescente número de poros e canais formados na matriz durante a degradação do polímero. É possível prever que a liberação do fármaco, *in vivo*, ocorreria em um intervalo de tempo mais reduzido quando comparado aos resultados observados *in vitro* e este fato pode ser atribuído ao meio em que se encontravam os implantes no corpo vítreo, que não representa exatamente o mesmo meio onde eles se localizavam no estudo *in vitro*. As condições do meio que circunda o implante influenciam fortemente no perfil de liberação. O transporte do fármaco no corpo vítreo e o seu perfil de eliminação no olho, não encontrados no meio *in vitro*, mas que aparecem no meio *in vivo*, contribuem para uma liberação mais rápida do fármaco. A natureza do meio e dos tecidos adjacentes presentes criam gradientes de concentração dentro do corpo vítreo que devem ser considerados ao se desenvolver sistemas de liberação (Friedrich S, Saville B, Cheng Y L. Drug distribution in the vitreous humor of the human eye: the effects of aphakia and changes in retinal permeability and vitreous diffusivity. Journal of ocular pharmacology and therapeutics, v. 13, p. 445-459,

1997; Tojo K, Isowaki A. Pharmacokinetic model for in vivo/in vitro correlation of intravitreal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v. 52, p. 17-24, 2001).

Concentrações efetivas de dexametasona para a supressão de
 5 processos inflamatórios encontram-se na faixa de 150 a 4000 ng/mL (Culpepper J A, Lee F. Regulation of IL 3 expression by glucocorticoids in cloned murine T lymphocytes. *Journal of immunology*, v. 135, p. 3191-3197, 1985; Lewis G D, Campbell W B, Johnson A R. Inhibition of prostaglandin synthesis by glucocorticoids in human endothelial cells.
 10 *Endocrinology*, v. 119, p. 62–69, 1986; Grabstein K, Dower S, Gills S, Urdal D, Larsen, A. Expression of interleukin 2, interferon- γ , and the IL 2 receptor by human peripheral blood lymphocytes. *Journal of immunology*, v. 136, p. 4503–4508, 1986; Knudsen P J, Dinarello C A, Strom T B. Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression
 15 of interleukin 1 in U937 cells. *Journal of immunology*, v. 139, p. 4129–4134, 1987; Lee S W, Tsou A P, Chan H, Thomas J, Petri K, Eugui E M, Allison A C. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 β gene and decrease the stability of interleukin 1 β mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*
 20 *America*, v. 85, p. 1204-1208, 1988). Concentrações equivalentes e mesmo superiores, que não causariam reações tóxicas, foram encontradas durante todo o período do estudo.

Para doenças do segmento posterior do olho, principalmente para as uveítes, implantes não-biodegradáveis desenvolvidos por Jaffe e
 25 colaboradores apresentaram uma liberação prolongada de corticóides por vários anos (Jaffe G J, Ben-Nun J, Guo H, Dunn J P, Ashton P Fluocinolone acetonide sustained drug delivery device to treat severe uveitis. *Ophthalmology*, v. 107, p. 2024-2033, 2000.). Este sistema, no entanto, precisa ser removido após completa liberação do fármaco, ou,

caso não seja, permanece no local até que seja realizada uma cirurgia para sua retirada. A vantagem do sistema biodegradável desenvolvido é que ele não necessita remoção subsequente.

Exemplo 8: Método de ELISA para análise de acetato de dexametasona

A metodologia de ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) foi utilizada para determinar a concentração de acetato de dexametasona liberada no corpo vítreo a partir dos implantes biodegradáveis desenvolvidos. O corpo vítreo dos animais do grupo 2 (controle), retirado semanalmente, também foi analisado e serviu como controle negativo.

Para esta finalidade foi utilizado um *kit* comercial para dosagem específica de corticóides (Corticosteroid Elisa Kit, DM 2156, Randox Laboratories Ltd., London, UK), o qual foi mantido embalado, protegido da luz e sob refrigeração até a execução dos ensaios, observando o prazo de validade. O fotômetro Multiskan® MS (Titertek, EUA) foi usado para a leitura das placas.

Foi feita uma curva de calibração, aplicando-se cada um dos seis padrões fornecidos com o *kit* (0; 0,1; 0,2; 0,98; 4,98 e 9,0 ng/ml) em oito diferentes microcavidades. A curva de calibração foi determinada por análise de regressão, relacionando o logaritmo (Ln) da concentração com os valores de absorbância, utilizando o programa WindowChem Software™ – Standard Curves, (versão 4.3, Hypnovista software, EUA)

Foram analisadas soluções padrões de acetato de dexametasona em concentrações dentro do intervalo da curva fornecida pelo fabricante do *kit* (8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 ng/ml). Estas soluções foram preparadas em solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Em paralelo, foram analisados brancos do corpo vítreo e da solução tampão fosfato, em duplicata, para verificação da ausência de interferentes.

Para a realização da análise, as amostras foram descongeladas a

temperatura ambiente e submetidas a análise sem tratamento prévio, de acordo com as instruções do fabricante do *kit*. As amostras do corpo vítreo foram utilizadas em duplicata após homogeneização e diluídas para se encontrarem dentro do intervalo da curva de calibração. A
5 quantidade de acetato de dexametasona liberada foi expressa como concentração equivalente, em ng/ml de corpo vítreo.

Os dados obtidos da curva de calibração foram analisados por regressão linear (GraphPad Prism® 3.00. GraphPad Software Incorporated, EUA); o fator de diluição foi multiplicado em todas as
10 amostras para que se obtivesse as concentrações reais do fármaco.

Exemplo 9: Porcentagem de acetato de dexametasona restante nos dispositivos implantados de acordo com o Exemplo 7

A quantidade de acetato de dexametasona restante nos dispositivos foi obtida pela porcentagem do fármaco presente nos
15 implantes *versus* a sua concentração inicial.

Para esta análise, três implantes retirados dos olhos dos animais, por semana, foram delicadamente lavados com água destilada e, em seguida, dissolvidos em um volume fixo de acetonitrila. A concentração de acetato de dexametasona foi medida por meio de cromatografia
20 líquida de alta eficiência, utilizando o método descrito no Exemplo 6.

A porcentagem de acetato de dexametasona ainda presente nos sistemas implantados no corpo vítreo dos coelhos, na sexta semana, foi de aproximadamente 40%, ou melhor, os dispositivos liberaram, *in vivo*, aproximadamente 60% do fármaco em 6 semanas. Após seis semanas
25 não foi possível avaliar a quantidade de fármaco restante nos implantes, pois os sistemas se apresentavam bastante degradados e, portanto, não era possível removê-los dos olhos enucleados.

Exemplo 10: Estudo de biodegradação *in vivo* dos dispositivos implantados de acordo com o Exemplo 7

As modificações morfológicas na superfície dos dispositivos desenvolvidos contendo acetato de dexametasona retirados dos olhos dos coelhos foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura.

5 Os implantes retirados, selecionados aleatoriamente, antes de serem visualizados ao microscópio, foram delicadamente lavados com água destilada, secados com lenço de papel absorvente para retirar o excesso de água e mantidos por 72 horas em dessecador a vácuo contendo sílica gel com indicador azul a temperatura ambiente. Em
10 seguida, eles foram montados em suportes porta-amostras de alumínio, inteiros, sem necessidade de cortes, na posição horizontal, para melhor analisar o tamanho e também as características da superfície. Os implantes foram aderidos aos suportes utilizando cola branca e, imediatamente após, foram colocados novamente em dessecador por, no
15 mínimo 24 horas antes do processo de metalização. Visando conferir condutividade à superfície dos implantes a serem analisados, procedeu-se a uma metalização com ouro, sob atmosfera de argônio, durante 1 minuto. Foi utilizado, nesta etapa, o acessório DSV 203 do equipamento BAF 300 da Balzers (EUA). Não foi possível estimar, por meio do
20 equipamento disponível, a espessura da camada de ouro formada.

As amostras foram observadas no microscópio Zeiss DSM 950 (Carl Zeiss NTS GmbH, Alemanha) na voltagem de 15 kV. A superfície dos implantes foi visualizada nos aumentos de 20X e 1000X e as imagens foram transferidas para o computador por meio de uma interface
25 digital de transferência de imagens. As imagens obtidas foram ajustadas utilizando os programas Adobe Photoshop versão 6.0 e Adobe Illustrator versão 9.01 (Adobe Systems Incorporated, 2000, EUA). Os sistemas não implantados no olho dos animais também foram analisados para comparação, utilizando o mesmo protocolo descrito anteriormente.

Pelas fotomicrografias obtidas foram observadas modificações na superfície e na forma dos sistemas desenvolvidos durante a biodegradação no olho. Após 5 semanas, não foi possível estudar a superfície dos implantes pois eles se encontravam muito frágeis e não foram capazes de suportar o feixe de elétrons utilizado no procedimento de visualização das imagens.

A morfologia de superfície de sistemas poliméricos apresenta um papel importante na degradação do sistema e na liberação do fármaco (Dash A K, Cudworth II G C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. Journal of pharmacological and toxicological methods, v. 40, p. 1-12, 1998). Os poros e canais nas matrizes permitem a difusão do fármaco possivelmente não dependente da degradação polimérica. As matrizes de PLGA degradam por hidrólise das ligações éster formando seus monômeros constituintes, os ácidos láctico e glicólico (PARK T G. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. Biomaterials, v. 16, p. 1123-1130, 1995). Alguns estudos mostraram que a degradação destes polímeros ocorre mais rapidamente no centro do sistema que na sua superfície (Kunou N, Ogura Y, Hashizoe M, Honda Y, Hyon S H, Ikada Y. Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits. Journal of controlled release, v. 37, p. 143-150, 1995; Kunou N, Ogura Y, Honda Y, Hyon S H, Ikada Y. Biodegradable scleral implant for controlled intraocular delivery of betamethasone phosphate. Journal of biomedical materials research, v. 51, p. 635-641, 2000). Desta forma, canais aquosos são formados durante o processo de degradação, conectando a superfície ao interior do implante e permitindo a difusão do fármaco através dos canais da matriz polimérica (Kunou N, Ogura Y, Yasukawa T, Kimura H, Miyamoto H, Honda Y, Ikada Y. Long-term sustained release of ganciclovir from biodegradable scleral implant for the

treatment of cytomegalovirus retinitis. Journal of controlled release, v. 68, p. 263–271, 2000). Os poros e canais nas matrizes podem promover um aumento da entrada de água nos implantes e este fato pode, conseqüentemente, acelerar o processo de degradação. A superfície dos implantes contendo acetato de dexametasona se apresentou inicialmente lisa, sem evidência de poros ou canais. Uma semana após implantação os poros começaram a surgir e foram aumentando ao longo do estudo. Os poros observados podem ser atribuídos à liberação do fármaco ou à absorção de água pelo sistema.

Exemplo 11: Estudo da toxicidade dos dispositivos desenvolvidos por moldagem a quente no Exemplo 1

Primeiramente, foi realizado um exame clínico nos olhos dos coelhos. Seis animais de cada grupo (teste e controle) foram avaliados por dois examinadores externos.

A avaliação clínica incluiu exames de inspeção ocular e oftalmoscopia binocular indireta antes da cirurgia e semanalmente após a implantação dos sistemas até a oitava semana. Os seguintes dados clínicos foram pesquisados: quemose, hiperemia ou secreção conjuntival, edema de córnea, hipópio, catarata, opacidade vítrea e descolamento de retina.

A pressão intra-ocular (PIO) de ambos os olhos de cada coelho foi medida antes da cirurgia e nas semanas 1, 4 e 8 subseqüentes. Antes das medidas de PIO, foi aplicada a solução tópica de cloridrato de proximetacaína 0,5%p/v nos olhos dos animais.

Por meio de inspeção ocular e oftalmoscopia binocular indireta não se observaram evidências de toxicidade do fármaco ou opacidade dos meios oculares nos animais de ambos os grupos durante o período de 8 semanas do estudo. Algumas complicações cirúrgicas foram encontradas nos olhos de dois animais do grupo 1 (teste): um deles apresentou

inflamação grave quatro dias após implantação do sistema, sugerindo um diagnóstico de endoftalmite, e o outro animal apresentou descolamento de retina após 3 semanas de implantação no local da esclerotomia. Estes dois animais foram excluídos do estudo.

- 5 O implante permaneceu junto à parede ocular, no local correspondente à esclerotomia, em todas as semanas do estudo, mostrando sinais de degradação evidentes a partir da quinta semana.

Com relação à pressão intra-ocular, um animal do grupo 1 (teste) apresentou um valor médio de pressão de 25,33 mmHg, representando
10 um aumento de 10 mmHg em relação ao valor medido antes da implantação. Nos outros animais de ambos os grupos, nos quais a PIO foi medida, não houve aumento da pressão, a qual se encontrou abaixo de 20 mmHg na oitava semana. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na PIO quando os valores basais (medidos
15 antes da implantação) foram comparados aos obtidos na primeira, quarta e oitava semanas após colocação dos implantes, no grupo 1 (teste) ($P=0,0544$) e no grupo 2 (controle) ($P=0,2500$). As análises estatísticas da PIO entre os dois grupos também não mostraram diferenças significativas antes ($P=0,4705$) ou após 1 semana ($P=0,8852$), 4
20 semanas ($P=0,3123$) e 8 semanas ($P=0,5637$) da implantação.

Em seguida, a função retiniana foi avaliada em ambos os olhos dos mesmos 6 animais dos grupos 1 e 2 utilizados no exame clínico por meio de eletrorretinografia (ERG) (LKC, modelo EPIC 2000, EUA). Os eletrorretinogramas foram registrados antes da implantação e 8 semanas
25 após a cirurgia para colocação dos implantes descrita no Exemplo 7.

O eletrorretinograma realizado não mostrou sinais de toxicidade retiniana em nenhum dos 6 animais do grupo 1 (teste) que pudessem ter sido causados pelo fármaco ou pela presença do sistema polimérico no corpo vítreo.

Na oitava semana, as amplitudes de onda A ($P=1,000$) e B ($P=0,5637$) não apresentaram diferenças significativas dos valores medidos antes da implantação dos dispositivos biodegradáveis. Os valores médios observados antes e após o procedimento de implantação dos dispositivos foram de $83,75\mu V$ e $76,65\mu V$ para a amplitude de onda A e de $154,50\mu V$ e $158,00\mu V$ para a amplitude de onda B, respectivamente. O intervalo de confiança empírico para a amplitude de onda A foi de 64,00-91,80 antes da implantação e de 74,30-96,70 na oitava semana, e para a amplitude de onda B foi de 107,00-208,00 antes do procedimento cirúrgico e de 155,00-220,00 após 8 semanas de implantação.

Finalmente, um estudo histopatológico foi realizado. Seis coelhos de cada grupo (teste e controle), utilizados no estudo eletrorretinográfico, foram sacrificados com dose letal de pentobarbital 100 mg/kg, 8 semanas após implantação dos sistemas, para análise histopatológica. Os olhos experimentais foram imediatamente enucleados e preparados para as microscopias de luz e eletrônica.

Os segmentos posteriores dos olhos enucleados foram fixados por 5 horas a $4^{\circ}C$, em solução tampão fosfato de Sorensen (0,1M; pH 7,2) contendo formaldeído 4%. Após lavagem com o tampão, pequenos pedaços das amostras foram refixados em glutaraldeído 2,5% no mesmo tampão acima, por 3 horas a $4^{\circ}C$. Em seguida, as amostras foram fixadas com tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas a $4^{\circ}C$. Estas amostras foram, então, desidratadas por imersão em soluções de etanol de concentrações crescentes, tratadas com óxido de propileno e incluídas em resina LX 112 (Ladd Research Ind., Burlington, VT, EUA). As seções semifinas ($0,5\mu m$) foram coradas com azul de toluidina para análise por microscopia de luz, enquanto os cortes ultrafinos foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão após contraste com acetato de

uranila e citrato de chumbo.

O estudo histopatológico dos olhos analisados não mostrou sinais de toxicidade retiniana ou infiltração de células inflamatórias.

5 Não foram observadas anormalidades estruturais na oitava semana seguinte à implantação dos sistemas após análise por microscopia de luz e por microscopia eletrônica de transmissão. A anatomia normal da retina foi preservada nos olhos dos animais.

O dispositivo desenvolvido se mostrou biocompatível com o olho, pois não foram observadas reações tóxicas significativas na retina pelas
10 análises de eletrorretinografia e histopatologia.

Exemplo 12: “Mini-dispositivo” desenvolvido pelo método de moldagem a quente conforme Exemplo 1

Dispositivos biodegradáveis contendo acetato de dexametasona foram desenvolvidos pelo método de moldagem a quente conforme
15 descrito no Exemplo 1. Estes sistemas apresentavam peso médio de $1,5 \pm 0,2$ mg e $8,0 \pm 0,3$ mm de comprimento e $0,40 \pm 0,03$ mm de diâmetro e são referidos neste relatório como “mini-dispositivos”.

Os mini-dispositivos adicionalmente desenvolvidos apresentaram 86% de liberação do fármaco, *in vitro*, em 42 dias.

20 Estes sistemas foram, em seguida, implantados em olhos de coelhos por meio de uma cânula transcleral de 25-gauge, ou seja, não foi necessário procedimento cirúrgico. A dexametasona foi liberada no vítreo dos animais dentro da faixa terapêutica por um período de 21 dias e não se observaram alterações histológicas na retina e/ou elevação da
25 pressão intra-ocular.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação farmacêutica para administração intraocular de fármacos, caracterizada por compreender o fármaco acetato de dexametasona inserido em implante biodegradável, compreendendo o polímero biodegradável poli D,L-lático-co-glicólico, na proporção de 1,4 mg de acetato de dexametasona para 3,6 mg de polímero do tipo poli D,L-lático-co-glicólico, com diâmetro entre 0,2 e 1,2 mm e comprimento entre 1,0 e 4,0 mm.

2. Processo de obtenção da formulação farmacêutica para administração intraocular de fármacos definida na reivindicação 1, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) pesagem de 1,4 mg de acetato de dexametasona e 3,6 mg de polímero do tipo poli D,L-lático-co-glicólico, os quais foram solubilizados em uma mistura de acetonitrila e água destilada (2:1);
- b) filtração da solução obtida na etapa “a”, utilizando filtro estéril de 0,22 µm, sob fluxo laminar;
- c) liofilização da solução filtrada obtida na etapa “b”;
- d) compressão ou moldagem a quente da solução obtida na etapa “c”.