



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

(11) PI 0821740-8 B1



(22) Data do Depósito: 18/12/2008

(45) Data de Concessão: 18/05/2021

(54) Título: SISTEMA I DE LIBERAÇÃO DE DROGA

(51) Int.Cl.: A61K 47/20; A61K 9/14; A61P 35/00; A61P 37/06.

(30) Prioridade Unionista: 19/12/2007 SE PCT/SE07/001127.

(73) Titular(es): OASMIA PHARMACEUTICAL AB.

(72) Inventor(es): JULIAN ALEKSOV; IGOR LOKOT.

(86) Pedido PCT: PCT SE2008051515 de 18/12/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/078802 de 25/06/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/06/2010

(57) Resumo: SISTEMA I DE LIBERAÇÃO DE DROGA. Esta invenção se refere a um sistema de liberação de droga para administração de substância farmacologicamente ativa pouco solúvel em água, uma composição farmacêutica compreendendo tal sistema de liberação de droga. A invenção também se refere a um método de controle do tamanho da partícula e/ou forma da partícula e/ou distribuição do tamanho da partícula em tal sistema de liberação de droga, e a um método para aumentar a capacidade de carregamento de droga das partículas. Além disso, a invenção também se refere ao uso de tal sistema de liberação de droga para a preparação de um medicamento para o tratamento de câncer.

SISTEMA I DE LIBERAÇÃO DE DROGA

Campo da invenção

[0001] Esta invenção se refere a um sistema de liberação de droga para administração de substâncias farmacologicamente ativas pouco solúveis em água, uma composição farmacêutica compreendendo tal sistema de liberação de droga, e um método de preparação de tal sistema de liberação de droga. A invenção também se refere a um método de controle do tamanho da partícula e/ou formato da partícula e/ou distribuição do tamanho da partícula em tal sistema de liberação de droga, e um método para aumentar a capacidade de carregamento da droga nas partículas. Além disso, a invenção também se refere ao uso de tal sistema de liberação da droga para a preparação de um medicamento para a preparação de um medicamento para o tratamento de câncer.

Fundamentos da Invenção

[0002] Há uma necessidade crítica nas indústrias farmacêuticas e outras relacionadas em formular substâncias insolúveis ou pouco solúveis em água industrialmente úteis para formulações para rotas de liberação oral, injetável, inalação, oftálmica e outras. Substâncias insolúveis ou pouco solúveis em água industrialmente úteis incluem compostos insolúveis ou pouco solúveis em água biologicamente úteis, agentes de contraste, compostos farmacologicamente úteis e em particular drogas insolúveis e pouco solúveis em água para medicina humana e veterinária.

[0003] Nenhuma limitação é imposta sobre o tipo de substâncias insolúveis ou pouco solúveis em água industrialmente úteis para uso na presente invenção. Exemplos incluem antipiréticos, anti-inflamatórios, analgésicos, atarácicos, sedativos, agentes antitumorais, antimicrobianos, antibióticos, antilipêmicos, antitussígenos/expectorantes, relaxantes musculares, antiepiléticos, antiúlceras, antidepressivos, antialérgicos, cardiotônicos, antiarrítmicos, vasodilatadores, hipotensores/diuréticos, terapêuticos para diabetes, tuberculostáticos, antirreumáticos, esteróides, antagonistas de narcóticos, hormônios, vitaminas lipossolúveis, anticoagulantes, terapêuticos para doenças

isquêmicas, terapêuticos para doenças imunológicas, terapêuticos para o mal de Alzheimer, terapêuticos para osteoporose, terapêuticos para vaso formação, terapêuticos para retinose, terapêuticos para oclusão de veia retinal, degeneração macular disciforme senil, terapêuticos para espasmo cerebrovascular, terapêuticos para trombose cerebral, terapêuticos para enfarte cerebral, terapêuticos para oclusão cerebral, terapêuticos para hemorragia intracerebral, terapêuticos para hemorragia subaracnóide, terapêuticos para encefalopatia hipertensiva, terapêuticos para ataque isquêmico cerebral transiente, terapêutico para demência multi-infarto, terapêuticos para arteriosclerose, terapêuticos para doença de Huntington, terapêuticos para desordem do tecido cerebral, terapêuticos para neuropatia óptica, terapêuticos para glaucoma, terapêuticos para hipertensão ocular, terapêuticos para descolamento retinal, terapêuticos para artrite, drogas antissépticas, drogas de choque antisséptico, drogas antiasma, terapêuticos contra polaciúria/incontinência, terapêuticos para rinite alérgica, terapêuticos para rinite alérgica, composições de cosméticos, composições agroquímicas, inseticidas, bactericidas, herbicidas, composições de bebidas ou alimentos, imunossupressores e composições de drogas de animais.

[0004] O fato de que apenas substâncias solúveis em água podem ser administradas intravenosamente consideravelmente empobrece a variedade de moléculas orgânicas que podem ser usadas como drogas antineoplásicas, uma vez que muitas se não a maioria destas são fracamente solúveis em água.

[0005] A incorporação de funções polares em tais substâncias não soluciona este problema devido às mudanças da estrutura conduzirem a uma perda das propriedades farmacológicas relevantes das drogas.

[0006] O desenvolvimento de sistemas de liberação de droga que poderia viabilizar a dissolução de compostos fracamente solúveis em soluções aquosas seria muito instrumental nos esforços de realização do potencial anticâncer de um vasto número de substâncias, e poderia prover a criação de novas gerações de drogas.

[0007] Paclitaxel e docetaxel pertencem à classe taxana de drogas anticâncer devido estas ou suas precursoras serem produzidas pelas plantas do

gênero Taxus (teixos). Paclitaxel ainda é produzido por isolamento dos recursos naturais enquanto docetaxel, um análogo semissintético de paclitaxel, é sintetizado a partir de 10-deacetil bacatina. Paclitaxel difere de docetaxel por uma função hidroxila acetilada na posição 10 e uma porção benzoíla ao invés de tert-butil na cadeia lateral de fenilpropionato. O mecanismo de ação das taxanas é baseado na sua habilidade em se ligar a subunidade β de tubulina que interfere na despolimerização dos microtúbulos, danificando deste modo, as células em divisão. Esta especificidade de ação é amplamente utilizada na oncologia para tratar diferentes tumores sólidos, especialmente câncer ovariano, pulmonar, mamário, bexiga, cabeça e pescoço.

[0008] Paclitaxel e docetaxel apresentam pouca biodisponibilidade oral e deste modo infusão intravenosa (i.v.) é o único modo de administração. A escassa solubilidade em água também torna impossível utilizar soluções aquosas dessas taxanas. Vários veículos de liberação têm sido aplicados para solucionar este problema.

[0009] TAXOL[®] se baseia na habilidade de CREMOPHOR[®] EL, um óleo de rícino polietoxilado, para dissolver paclitaxel na proporção peso por peso (p/p) 87:1. Esta é cronologicamente, a primeira formulação de taxana comercial que abriu a era do uso de taxana na oncologia. Contudo, depois foi encontrado que CREMOPHOR[®] é a causa das reações hipersensíveis durante a infusão de TAXOL[®] e para minimizar a incidência e gravidade dessas reações um premedicamento com bloqueadores de histamina e glucocorticóides, bem como, programação de infusão contínua se tornaram uma prática padrão.

[00010] Em um segundo sistema de liberação chamado TAXOTERE[®], Polisorbato 80 (conhecido sob a marca registrada TWEEN[®]80), um derivado de sorbitol polietoxilado e ácido oléico, tem a função de veículo. No caso da proporção ser 24:1. Como CREMOPHOR[®] EL, Polisorbato 80 é um detergente não-iônico formado de cadeias polietoxi, também pode induzir reações de hipersensibilidade.

[00011] ABRAXANE[®], um terceiro sistema de liberação, consiste

em nanopartículas de paclitaxel estabilizadas por soro albumina humana na proporção 9:1 p/p com um diâmetro médio de nanopartículas sendo de banco de dados 130 nm. A ausência de surfactantes não iônicos simplifica o tratamento, uma vez que nenhum premedicamento é necessário e o tempo de infusão é encurtado.

5 Por outro lado, a formulação ABRAXANE® é menos potente do que TAXOL® devido às nanopartículas de ABRAXANE®, como outras partículas com tamanho de mais do que 100 nm são um substrato para o sistema reticuloendotelial. Uma outra desvantagem desse veículo de liberação de droga é que soro albumina humana isolada do sangue doador é utilizada, o que sempre traz um pequeno, mas
10 definitivo risco de transmissão de doenças virais.

[00012] Finalmente, foi encontrado que paclitaxel e docetaxel podem ser dissolvidos em soluções aquosas de derivados solúveis em água de ácido retinóico que agem como surfactantes aniônicos. A exclusividade da estrutura desses derivados os possibilita dissolver paclitaxel e docetaxel na
15 surpreendentemente baixa proporção de 0,5:1 p/p.

[00013] Ixabepilone, (análogo de epotilone B) é muito similar às taxanas em termos de modo de ação e solubilidade em soluções aquosas. Este é indicado no tratamento de câncer de mama metastático ou localizado avançado. A formulação de ixabepilone para administração IV, Ixemptra, desenvolvido pela BMS,
20 como Taxol, é baseado em cremophor EL e deste modo um premedicamento e infusão prolongada para a redução das reações de hipersensibilidade são requeridos.

[00014] Etoposide, análogo da toxina podofilotoxina, é inibidor de topoisomerase II e é usado no tratamento de sarcoma de Ewing, câncer de
25 pulmão, câncer de testículo, linfoma e leucemia linfocítica. Formulações de etoposide para administração IV são baseadas em derivados de PEG, tal como Polisorbato 80 (TWEEN 80) ou Macrogol 300 de modo a solubilizar o ingrediente ativo pouco solúvel em água.

[00015] Retinóides compreendem uma família de
30 poliisoprenóides que incluem vitamina A (retinol) e seus análogos natural (ácido

retinóico) e sintético (fenretineto, etretinato, tazaroteno, bexaroteno, adapaleno). Esses compostos mostram um amplo espectro de atividade biológica que inclui a participação no controle da proliferação celular, a diferenciação celular e o desenvolvimento embriônico que possibilita o uso de retinóides como agentes antineoplásicos para tratamento de diferentes tipos de câncer tal como leucemia, linfoma, sarcoma de Kaposi, câncer pulmonar e câncer de mama. Esses compostos são também usados no tratamento de diferentes doenças de pele como psoríase, acne, e pele danificada pelo sol. Retinóides são frequentemente compostos altamente lipofílicos e seu uso na forma de solução aquosa demanda aplicação de algum sistema de liberação. Contudo, ao que sabemos não há qualquer formulação solúvel em água comercialmente desenvolvida de retinóides e estas estão disponíveis exclusivamente para administração oral.

[00016] Ciclosporina, sirolimus, tacrolimus, e everolimus são imunossupressores que são escassamente solúveis em água. A biodisponibilidade das drogas na administração oral é de apenas cerca de 20%. Formulações comercialmente disponíveis desses imunossupressores são baseados apenas no uso de óleo de rícino polioxietilado, que causa reações de hipersensibilidade quando administrado intravenosamente.

[00017] Ciclosporin, ciclosporina, ou cyclosporin, são drogas imunossupressoras amplamente utilizadas em transplante de órgãos pós-alogênico para reduzir a atividade do sistema imune do paciente e assim, o risco de rejeição do órgão. Este tem sido estudado em transplantes de pele, coração, rim, fígado, pulmão, pâncreas, medula óssea e intestino delgado. Inicialmente, isolado de uma amostra de solo norueguês, Ciclosporina A, a forma principal da droga, é um peptídeo não ribossomal cíclico de 11 aminoácidos (um undecapeptídeo) produzido pelo fungo *Tolypocladium inflatum* Gams, e contém D-aminoácidos, que são raramente encontrados na natureza.

[00018] A pesquisa e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de drogas tem aumentado com a realização do fato de que as drogas em concentrações muito altas são tóxicas e – na melhor situação – inativa em

concentrações muito baixas; contudo, a exposição de uma célula a concentrações muito baixas de drogas frequentemente ativam mecanismos de resistência à droga. A faixa de concentrações onde a droga consegue a resposta desejada com menos efeitos colaterais é conhecida como “janela terapêutica”.

5 [00019] Infusões prolongadas têm provado reduzir a toxicidade dos agentes anticâncer, mas esse modo de administração é significativamente mais complicado do ponto de vista prático.

 [00020] Encontrou-se que a liberação lenta da droga pode ser alcançada pelo uso de drogas que estão ligadas ou encapsuladas em
10 nanopartículas de diferentes tipos. Estas partículas podem circular no sangue por vários dias exercendo a função de “depósitos”. A liberação da droga ocorre por difusão das drogas encapsuladas ou pela erosão e decomposição das partículas. Os tipos mais populares de nanopartículas neste campo de pesquisa são as micelas e os lipossomas, como a formação de tais nanopartículas é um processo
15 impulsionado por uma entropia bastante simples, isto é, elas emergem espontaneamente e suas propriedades são programadas pelas condições da formação. O tamanho das partículas utilizado nesses sistemas de liberação está dentro da faixa de 8 a 200 nm e mesmo maiores.

 [00021] Contudo, com o aumento do tamanho, uma partícula se
20 torna “visível” ao sistema retículo-endotelial, uma parte do sistema imune que consiste das células fagocíticas localizadas no tecido conectivo reticular de nódulos linfáticos, fígado e baço. A extensão da remoção do sistema retículo-endotelial aumenta com o tamanho das partículas, reduzindo significativamente a quantidade total da droga no fluxo sanguíneo.

25 [00022] Um outro desafio intrigante no campo da liberação de drogas é o direcionamento das drogas para afetar compartimentos que poderiam aumentar a efetividade terapêutica até os últimos níveis. As nanopartículas têm sido úteis a esse respeito. Tumores sólidos diferem patoanatomicamente dos tecidos saudáveis por uma extensiva angiogênese, bem como, uma arquitetura
30 vascular hiperpermeável e defeituosa. Em outras palavras o tamanho dos capilares

do tumor é maior, tornando-os potencialmente possíveis de aumentar significativamente o transporte passivo de nanopartículas carregadas com carga citotóxica para o tumor em comparação com um endotélio saudável.

[00023] US 2004048923 descreve um grupo de retinóides que inclui entre numerosos outros, o sal sódico de metil éster de ácido N-(todos-trans-retinoil)-L-cistéico metil éster e o sal sódico de ácido N-(13-cis-retinoil)-L-cistéico metil éster. Tem afirmado que as substâncias tornam possível fabricar novas formulações de micelas de compostos farmacêuticos pouco solúveis como paclitaxel e docetaxel.

10 [00024] WO 02092600 se refere a um método de preparação de uma formulação solúvel em água de paclitaxel, compreendendo as etapas de dissolver paclitaxel em um primeiro solvente, dissolver um composto selecionado entre ácido N-(todos-trans-Retinoil)-L-cistéico, ácido N-(13-cis-Retinoil)-L-cistéico, ácido N-(todos-trans-Retinoil)-L-homocistéico, ácido N-(13-cis-Retinoil)-L-homocistéico, ácido N- (todos-trans-Retinoil)-L-cisteinasulfínico, e ácido N-(13-cis-Retinoil)-L-cisteinasulfínico em um segundo solvente, misturando as alíquotas das soluções resultantes de paclitaxel e o dito composto em uma razão molar desejada, e evaporando a mistura resultante até a secura.

[00025] Embora a pouca solubilidade dos compostos farmacêuticos possam sugerir que estes estejam numa forma particular, US 2004048923 e WO 02092600 são ambas completamente silentes em relação ao tamanho e a morfologia das partículas. Não há nenhuma indicação ou sugestão em particular de que estas devem estar no estado amorfo, ou mesmo que estas devam existir em tal estado. Tampouco nenhuma forma de fornecer partículas em tal estado é revelada. Como é de conhecimento daqueles versados na arte do polimorfismo, incluindo possível amorfismo, é basicamente imprevisível para substâncias orgânicas.

[00026] O documento US2007082838A1 divulga uma composição farmacêutica de agentes pouco solúveis em água, como docetaxel e um agente estabilizador. Torchilin *et al.*, 2007 (DOI: 10.1007/s11095-006-9132-0) é

uma revisão especializada que geralmente analisa nanotransportadores micelares, por exemplo, micelas formadas por conjugados de copolímeros solúveis com lipídios, como conjugado de polietilenoglicol-fosfatidil etanolamina e PEG-PE.

Breve Resumo da Invenção

5 [00027] A criação de um novo sistema de liberação de droga com liberação de droga controlada ou programada antecipadamente que mimetiza as administrações prolongadas seria bastante desejada.

 [00028] Um objetivo da presente invenção é fornecer tal sistema de liberação de droga.

10 [00029] Assim, um aspecto da invenção se refere a um sistema de liberação de droga para administração de pelo menos uma substância farmacologicamente ativa que possui uma solubilidade *per se* em água de menos de cerca de 100 µg/ml, a dita substância estando na forma particulada com um tamanho de partícula médio efetivo menor do que cerca de 100 nm, onde as
15 partículas de substâncias são essencialmente amorfas; as partículas de substância são aprisionadas em nanopartículas formadas de um sal sódico do metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico do metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação destes; e a razão peso-por-peso do dito sal sódico do metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, sal sódico do metil
20 éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou combinação destas, para a dita substância estar na faixa de 0,5:1 a 20:1.

Breve Descrição dos Desenhos

 [00030] A presente invenção será descrita em mais detalhes na descrição seguinte, exemplos e desenhos anexos, em que:

25 [00031] Fig. 1 mostra a dependência do tamanho da partícula na razão p/p de sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico para paclitaxel em diferentes concentrações de paclitaxel em uma solução aquosa de cloreto de sódio numa concentração de 9 mg/ml.

 [00032] Fig. 2 mostra a dependência do tamanho da partícula
30 formada pelo sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico e

docetaxel (razão p/p 1:1) na concentração de cloreto de sódio em diferentes concentrações de docetaxel.

[00033] Fig. 3 mostra a dependência do tamanho da partícula formada pelo sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico e paclitaxel (razão p/p de paclitaxel:metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico é 1:2) na concentração de cloreto de cálcio em uma solução aquosa de cloreto de sódio numa concentração de 9 mg/ml.

[00034] Fig. 4 e 5 mostra o curso temporal do tamanho da partícula e o potencial Z de uma formulação obtida pela reconstituição de uma mistura liofilizada de paclitaxel, sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico e sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico na razão p/p 1:0,75:0,75 em uma solução aquosa de cloreto de sódio (9 mg/ml), cloreto de cálcio (2 mmol/l) e cloreto de magnésio (1 mmol/l).

[00035] Fig. 6 e 7 mostra o curso temporal do tamanho da partícula e o potencial Z de uma formulação obtida pela reconstituição de uma mistura liofilizada de docetaxel e sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico na razão p/p 1:2 em uma solução aquosa de cloreto de sódio (9 mg/ml) e cloreto de cálcio (3 mmol/l).

[00036] Fig. 8 mostra uma avaliação comparativa da citotoxicidade das formulações formadas pela mistura de docetaxel-sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico-sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico (p/p/p = 1:1:1) em culturas de linhagem de células de adenocarcinoma SKOV3 de ovário humano.

[00037] Fig. 9 mostra uma avaliação comparativa da citotoxicidade das formulações formadas pela mistura de paclitaxel-sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico-sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico (p/p/p = 1:0,75:0,75) em culturas de linhagem de células de adenocarcinoma SKOV3 de ovário humano.

[00038] Fig. 10 mostra a dependência do tamanho da partícula na razão p/p de sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico

para Ciclosporin A em diferentes concentrações de Ciclosporin A em uma solução aquosa de cloreto de sódio a uma concentração de 9 mg/ml.

Descrição das Realizações da Invenção

[00039] Antes da presente invenção ser revelada e descrita,
5 deve-se compreender que esta invenção não está limitada às configurações particulares, etapas de processo, e materiais aqui revelados em tais configurações, etapas de processo e materiais podem variar um pouco. Deve-se compreender também que a terminologia aqui empregada é usada com o objetivo de descrever realizações particulares apenas e não é pretendida para ser limitativa, uma vez que
10 o escopo da presente invenção será limitado apenas pelas reivindicações anexas e equivalentes destas.

[00040] Deve-se notar que, conforme usado nesse relatório e nas reivindicações, as formas do singular “um”, “uma”, e “o, a” incluem referências no plural a menos que o contexto claramente mencione o contrário.

15 [00041] Nesse relatório, a menos que de outro modo mencionado, o termo “cerca de” que modifica a quantidade de um ingrediente nos sistemas de liberação de droga ou composições da invenção ou empregada nos métodos da invenção se referem à variação na quantidade numérica que pode ocorrer, por exemplo, através da medida típica e procedimento de manipulação de
20 líquidos utilizados para concentrar ou utilizar soluções no mundo real; através erro inadvertido nesses procedimentos; através das diferenças na fabricação, fonte, ou pureza dos ingredientes empregados para produzir os sistemas de liberação de droga ou composições ou realização dos métodos; e similares. O termo “cerca de” também englobam quantidades que diferem devido às diferentes condições de
25 equilíbrio para uma composição que resulta de uma mistura inicial em particular. Se ou não modificada pelo termo “cerca de”, as reivindicações incluem equivalentes às quantidades.

[00042] Nesse relatório, a menos que de outro modo mencionado, o termo “sistema de liberação de droga” se refere a uma formulação
30 ou dispositivo que libera agente(s) terapêuticos para o(s) locais do corpo

desejado(s) e/ou fornece liberação intermitente dos agentes terapêuticos.

[00043] Nesse relatório, a menos que de outro modo mencionado, o termo “tamanho da partícula” se refere ao diâmetro médio Z conforme medido pelo espalhamento de luz dinâmico com o uso de laser vermelho com um comprimento de onda de 633 nm. Por “um tamanho de partícula médio efetivo menor do que cerca de 100 nm” significa que pelo menos 90% das partículas têm um tamanho menor do que 100 nm quando medida pela técnica acima citada.

[00044] Nesse relatório, a menos que de outro modo mencionado, o termo “nanopartícula” se refere a partícula microscópica cujo tamanho é medido em nanômetros. As nanopartículas da invenção tipicamente na faixa de cerca de 1 a cerca de 999 nm em diâmetro, e podem incluir uma molécula biologicamente ativa aprisionada, encapsulada ou aderida.

[00045] Nesse relatório, a menos que de outro modo mencionado, o termo “solubilidade” de uma substância a ser dissolvida em um solvente específico próximo da temperatura ambiente, a qual significa entre cerca de 15°C e cerca de 38°C.

[00046] Nesse relatório, a menos que de outro modo mencionado, o termo “amorfo” é pretendido indicar uma estrutura sólida que é tanto não-cristalina quanto consiste em cristais muito pequenos que possuem um tamanho de partícula de cerca de 10 nm ou menos.

[00047] Nesse relatório, a menos que de outro modo mencionado, o termo “composto citotóxico” se refere a um composto que é capaz de interromper o crescimento ou matar as células.

[00048] Nesse relatório, a menos que de outro modo mencionado, o termo “composto citostático” se refere a um composto que é capaz de conduzir as células, embora não necessariamente lisadas ou mortas, a um estado não-proliferativo permanente.

[00049] Nesse relatório, a menos que de outro modo mencionado, o termo “imunossupressor” se refere a um composto que é capaz de

inibir a atividade do sistema imunológico, particularmente, evitando a rejeição de um órgão transplantado e doenças onde o sistema imunológico do corpo ataca seus próprios tecidos.

5 [00050] Nesse relatório, a menos que de outro modo mencionado, o termo “derivado” se refere a um composto formado a partir da estrutura original tanto diretamente, por reação química da estrutura original, quanto pela “modificação” que é uma substituição parcial da estrutura original, ou por engenharia e síntese *de novo*. Derivados podem ser sintéticos, ou podem ser produtos metabólicos de uma célula ou uma reação enzimática *in vitro*.

10 [00051] Numa realização as partículas de substância no sistema de liberação de droga inventivo apresentam um tamanho de partícula médio efetivo menor do que cerca de 50 nm.

15 [00052] Numa outra realização as partículas de substância no sistema de liberação de droga inventivo apresentam um tamanho de partícula médio efetivo na faixa de cerca de 5-50 nm.

[00053] Numa outra realização as partículas de substância no sistema de liberação de droga inventivo apresentam um tamanho de partícula médio efetivo na faixa de cerca de 8-30 nm.

20 [00054] Em uma realização da presente invenção a razão peso-por-peso do sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou combinação destes, para a substância farmacologicamente ativa está na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 10:1.

25 [00055] Em uma realização da presente invenção a substância farmacologicamente ativa é um composto citotóxico ou citostático; em um aspecto dessa realização o composto citotóxico ou citostático é etoposide; em ainda um outro aspecto dessa realização do composto citotóxico ou citostático é uma taxana, e em um aspecto mais específico, a taxana é selecionada entre paclitaxel, docetaxel, e derivados destes. Em um outro aspecto específico da dita realização
30 da invenção se refere a um sistema de liberação de droga para uso no tratamento

de câncer.

[00056] Em uma realização da presente invenção a substância farmacologicamente ativa é um imunossupressor; em um aspecto dessa realização o imunossupressor é selecionado entre ciclosporina, sirolimus, tacrolimus e derivados desses. Em um outro aspecto da dita realização da invenção se refere a sistemas de liberação de droga para uso em transplante de órgão pós-alotransplante.

[00057] Uma outra realização da invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende um carreador farmacologicamente aceitável e um sistema de liberação de droga desse tipo.

[00058] Em um aspecto dessa realização a substância farmacologicamente ativa é um composto citotóxico ou citostático; em um aspecto dessa realização o composto citotóxico ou citostático é biscloronitrosourea (Carmustine); em um outro aspecto dessa realização o composto citotóxico ou citostático é etoposide; em ainda um outro aspecto dessa realização do composto é uma taxana, que pode ser selecionada entre paclitaxel, docetaxel, e derivados desses; em um outro aspecto dessa realização da presente invenção a substância farmacologicamente ativa é um imunossupressor; em um aspecto dessa realização o imunossupressor é selecionado entre ciclosporina, sirolimus, tacrolimus e derivados desses. Em um aspecto dessa realização a composição farmacêutica pode ser provida na forma de uma solução aquosa, um gel, um creme, um unguento, um comprimido, uma cápsula ou um softgel.

[00059] Uma outra realização da invenção se refere ao uso de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistérico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistérico, ou uma combinação desses, na preparação de tal sistema de liberação de droga.

[00060] Ainda uma outra realização da invenção se refere a um método para a preparação de um sistema de liberação de droga que compreende nanopartículas formadas de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistérico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistérico, ou uma combinação desses, e pelo menos uma substância farmacologicamente ativa

que possui uma solubilidade *per se* em água menor do que cerca de 100 µg/ml, onde a dita substância é fornecida na forma de partículas essencialmente amorfas com um tamanho de partícula médio efetivo de menos de cerca de 100 nm; o tamanho das ditas nanopartículas é controlado para apresentar um tamanho de partícula médio efetivo menor do que cerca de 100 nm pelo ajuste da razão peso-por-peso do dito sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou combinação desses, para a dita substância estar na faixa de cerca de 0,5:1 a cerca de 20:1. A presente invenção também fornece um sistema de liberação de droga obtenível por este método bem como uma composição farmacêutica que compreende um carreador farmaceuticamente aceitável e tal sistema de liberação de droga.

[00061] Ainda uma outra realização da invenção se refere a um método de controle do tamanho da partícula e/ou da forma da partícula e/ou da distribuição da partícula de nanopartículas formadas de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses, e pelo menos uma substância farmaceuticamente ativa que possui uma solubilidade *per se* em água menor do que cerca de 100 µg/ml num processo para a preparação de um sistema de liberação de droga, onde a dita substância é fornecida na forma de partículas essencialmente amorfas com um tamanho de partícula médio efetivo menor do que cerca de 100 nm; o tamanho de partícula e/ou forma da partícula e/ou distribuição do tamanho da partícula das ditas nanopartículas é controlado pelo ajuste da razão peso-por-peso do dito sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou combinação desses, a dita substância para estar na faixa de cerca de 0,5:1 a cerca de 20:1. Em um aspecto dessa realização o tamanho das nanopartículas é controlado para estar na faixa de cerca de 10-100 nm.

[00062] Ainda uma outra realização da invenção se refere a um método de controle do tamanho da partícula das nanopartículas formadas de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses, e pelo

menos uma substância farmacologicamente ativa que possui uma solubilidade *per se* em água menor do que cerca 100 µg/ml num processo de preparação de um sistema de liberação de droga, onde a dita substância é fornecida na forma de partículas essencialmente amorfas com um tamanho de partícula médio efetivo menor do que cerca de 100 nm; as ditas partículas amorfas são submetidas e/ou produzidas em uma solução aquosa que contém pelo menos um sal ionizado, a dita solução aquosa apresentando uma força iônica I; e o tamanho de partícula das nanopartículas é aumentado pelo crescimento I ou reduzido pelo decréscimo I.

[00063] Em um aspecto dessa realização a substância farmacologicamente ativa é uma taxana e pelo menos o dito sal ionizado é cloreto de sódio. Isto é útil para a produção de soluções de infusão i.v., já que íons de sódio e cloreto são os íons mais abundantes no corpo humano e também nos corpos de muitos animais.

[00064] Em um aspecto dessa realização o sal ionizado compreende cátions polivalentes, tal como, por exemplo, cátions de dupla valência. Tais cátions não apenas aumentam a força iônica do solvente de modo geral, aumentando assim o tamanho da particular, mas também estabilizam as partículas formadas.

[00065] O uso de partículas contendo taxana que possuem um tamanho dentro da faixa de cerca de 10-100 nm significativamente melhora a eficácia terapêutica desses compostos anti-câncer estendendo a circulação sanguínea das drogas, que diminui sua remoção retículo-endotelial e penetração seletiva da vascularização defeituosa. Além disso, as vantagens do uso de taxanas na forma de tais nanopartículas *in vivo*, isto é, liberação lenta da droga e aumentada permeabilidade da vascularização do tumor, também foi encontrado que a atividade das formulações de taxana que contém tais nanopartículas é mais expressada *in vitro* em diferentes linhagens de células de tumor sólido. Além disso, a citotoxicidade dessas formulações depende dramaticamente do tamanho da partícula.

[00066] Uma outra realização da invenção se refere a um

método para aumentar a capacidade de carregamento da droga das nanopartículas formadas por um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico do metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses, e pelo menos uma substância farmacologicamente ativa
5 que possui solubilidade *per se* em água menor do que 100 µg/ml em um processo de preparação de um sistema de liberação de droga pelo fornecimento da dita substância na forma de partículas essencialmente amorfas com um tamanho de partícula médio efetivo menor do que cerca de 100 nm; e ajuste da razão peso-por-peso do dito sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, sal
10 sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou combinação desses, a dita substância para estar na faixa de cerca de 0,5:1 a cerca de 20:1.

[00067] Em cada um dos ditos métodos inventivos, a substância farmacologicamente ativa pode ser provida na forma de partículas essencialmente amorfas com um tamanho de partícula médio efetivo menor do que cerca de 100
15 nm como modo de um método que compreende as etapas de: dissolver a dita substância em um solvente orgânico adequado para fornecer uma solução orgânica da dita substância; adicionar cerca de 0,01-3 molar equivalentes de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses, a dita
20 solução orgânica; e evaporar o dito solvente orgânico da dita solução orgânica para fornecer um resíduo que compreende a substância farmacologicamente ativa na forma de partículas essencialmente amorfas. Numa realização desse método cerca de 0,1-1 molar equivalentes de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil
25 cistéico, ou uma combinação desses, é adicionado à solução orgânica.

[00068] O método proposto é baseado na capacidade de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, bem como um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico para evitar a cristalização da substância farmacologicamente ativa, tal como, por exemplo, taxanas.

[00069] Durante a evaporação do solvente orgânico, o sal sódico

de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou combinação desses, co-cristalização com a substância farmaceuticamente ativa, formando um filme. A água adicionada a este filme dissolve o sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, sal
5 sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou combinação desses, e fornece a substância farmaceuticamente ativa em uma forma altamente amorfa com área de superfície tremendamente aumentada.

[00070] A solução assim obtida de partículas essencialmente amorfas da substância farmaceuticamente ativa pode ser utilizada diretamente sem
10 isolamento ou purificação para infusões ou para a fabricação de produtos liofilizados para futuras reconstituições.

[00071] Alternativamente, as partículas essencialmente amorfas da substância farmaceuticamente ativa podem ser providas na forma seca por meio de, por exemplo, evaporação, e então depois ser dissolvido em uma solução
15 aquosa compreendendo cerca de 0,01-50 molar equivalentes do dito sal sódico de metil éster de ácido de N-todos-trans-retinoil cistéico, sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou combinação desses. Numa realização, as ditas partículas da substância ativa podem ser dissolvidas em tal solução compreendendo cerca de 0,1-5 molaes equivalentes de um sal sódico de metil
20 éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou combinação desses. As partículas essencialmente amorfas são possíveis de serem dissolvidas em uma solução de sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou combinação desses, dentro de alguns minutos.

[00072] Em uma outra alternativa, uma solução da substância farmaceuticamente ativa em um solvente orgânico é adicionada a uma solução
25 aquosa de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses, após o que, o solvente orgânico é evaporado, permanecendo uma solução
30 aquosa que compreende a substância farmaceuticamente ativa numa forma

amorfa.

[00073] Esse método pode ser otimizado e simplificado pela disposição de um influxo de solução orgânica da substância farmacologicamente ativa em um balão de evaporação que contém uma solução aquosa de um sal
5 sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses, simultaneamente com a evaporação.

[00074] A velocidade de fluxo da solução orgânica, a pressão interna no sistema de evaporação, bem como, a temperatura de evaporação pode
10 ser selecionada de tal forma que a concentração da solução orgânica não exceda a 15%.

[00075] O solvente orgânico utilizado no processo para fornecer a substância farmacologicamente ativa na forma de partículas essencialmente amorfas pode ser um álcool tal como, por exemplo, metanol ou etanol. O uso de
15 metanol que possui ponto de ebulição mais baixo ao invés de etanol simplifica a evaporação das misturas álcool-água.

[00076] Contudo, como resíduos de solvente orgânico podem ser menos apropriados para aplicação direta *in vivo*, as soluções orgânicas das partículas essencialmente amorfas da substância farmacologicamente ativa podem,
20 por exemplo, ser liofilizadas para remover o solvente orgânico, deixando as partículas essencialmente amorfas da substância farmacologicamente ativa numa forma conveniente de pó para armazenagem e preparação de novas formulações.

[00077] De acordo com as outras realizações da presente invenção também são fornecidos:

25 [00078] - o uso do sistema de liberação de droga inventivo para a preparação de um medicamento para o tratamento de câncer, e um método para o tratamento de câncer em que o sistema de liberação de droga inventivo é administrado numa quantidade terapeuticamente efetiva a um paciente que necessita tal tratamento; e

30 [00079] - o uso da composição farmacêutica inventiva para a

preparação de um medicamento para o tratamento de câncer, e um método para o tratamento de câncer, em que a composição farmacêutica inventiva é administrada numa quantidade terapeuticamente efetiva a um paciente que necessita tal tratamento.

5 [00080] - o uso do sistema de liberação de droga inventivo para a preparação de um medicamento para uso em transplante de órgão pós-alogênico, e um método para o transplante de órgão pós-alogênico, em que o sistema de liberação de droga inventivo é administrado numa quantidade terapeuticamente efetiva a um paciente que necessita tal tratamento; e

10 [00081] - o uso da composição farmacêutica inventiva para a preparação de um medicamento para uso no transplante de órgão pós-alogênico, e um método para o transplante de órgão pós-alogênico, em que a composição farmacêutica inventiva é administrada numa quantidade terapeuticamente efetiva a um paciente que necessita tal tratamento.

15 [00082] As formulações de taxana solúvel em água obtidas com o uso de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses, são estáveis por várias horas no amplo intervalo de condições de formação dessas formulações.

20 [00083] Assim, a presente invenção torna possível fornecer soluções aquosas de taxanas, que de outra forma apresenta fraca solubilidade em água, como paclitaxel e docetaxel, por infusão sem qualquer uso de surfactantes não-iônicos. Isto reduz significativamente a reação de hipersensibilidade contra as soluções de infusão, encurta o tempo de infusão, e elimina a necessidade de
25 premedicação de pacientes contra tal hipersensibilidade.

 [00084] A invenção será ilustrada em mais detalhes nos exemplos não limitativos que se seguem.

Exemplos

MATERIAIS E MÉTODOS

30 [00085] As formulações de ingredientes farmacêuticos ativos

com um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses foram preparadas pela reconstituição tanto de resíduos de um ingrediente ativo recentemente evaporados ou liofilizados com derivados de ácido retinoil cistéico com uma solução específica para reconstituição.

[00086] Paclitaxel, Ciclosporina A e ácido todos-trans-retinóico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Suécia AB. Docetaxel foi adquirido de ScinoPharm Taiwan, Ltd. Ixabepilone foi adquirido de Chemtronica KB, Suécia. Fenretinida foi sintetizada de acordo com o procedimento padrão (Cancer Research, 39, 1339-1346, abril 1979). Taxol, Taxotere e Abraxane foram adquiridos em farmácias e reconstituídos de acordo com as informações prescritas pelos fabricantes.

[00087] O tamanho da partícula das formulações foi medido pelo método de espalhamento de luz dinâmico com o uso de um laser vermelho (633 nm). Potencial Zeta(Z) foi medido pelo método de espalhamento de luz eletroforético. Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd.) foi usado para a determinação tanto do tamanho da partícula quanto do potencial-zeta. As médias dos valores de três medições independentes foram calculadas por plotagem do tamanho da partícula e comportamento do potencial-zeta. As barras de erro de Y são compostas por +/- o desvio padrão das medições.

[00088] Para a avaliação da citotoxicidade *in vitro*, células de diferentes linhagens de células tumorais humanas foram adquiridas da "American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA): Linhagem de células de Adenocarcinoma humano de mama MDA-MB-231 (ATCC-HTB-26, Lot. 3576799), Linhagem de células de Adenocarcinoma humano de ovário SKOV-3 (ATCC-HTB-77, Lot. 3038337) e Linhagem de células de câncer de pulmão Não-Pequenas A549 (ATCC-CCL-185, Lot. 3244171). Células MDA-MB-231 foram propagadas em meio de cultura MEM com L-glutamina 2 mM, soro fetal bovino 10% (FBS) e antibióticos. Células SKOV-3 foram cultivadas em um meio de cultura McCoy's 5A, suplementado com L-glutamina 1,5 mM, FBS 10% e antibióticos. Todos os meios e

suplementos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mi., USA). A propagação celular de todas as linhagens foi realizada em frascos de cultura BD Falcon™ de 25 ou 75 cm² (Becton Dickinson Labware). Células A549 foram cultivadas em um meio de cultura Ham's F-12 com L-glutamina 1 mM, FBS 10% e antibióticos. A propagação celular das linhagens foi realizada em frascos de cultura BD Falcon™ de 25 ou 75 cm².

[00089] O teste de citotoxicidade da droga foi realizado utilizando placas de cultura BD Falcon™ de 96-poços para células aderentes (Becton Dickinson Labware). Essas placas foram semeadas com células a 8x10³ células/poço para MDA-MB-231, 10x10³ células/poço para SKOV-3 ou 6x10³ células/poço para A549 em um volume de 200 µl/poço. Ambos os frascos e placas de cultivo foram incubados para crescimento celular a 37° C em uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO₂.

[00090] As culturas de células das placas de cultura foram deixadas aderir por 24 horas de incubação. No dia 1 após a semeadura das células, 4 µL de soluções das formulações a serem testadas com diferentes concentrações em solventes apropriados foram adicionadas aos poços com as culturas (dose – experimentos de resposta). Nas culturas controle, 4 µL dos solventes foram adicionados como controle do solvente. As células foram incubadas por 2-4 dias consecutivos. No final do período de incubação as células aderentes foram destacadas por tripsinização e o número de células viáveis foi contado utilizando o teste de exclusão “trypan blue” e um hemocitômetro. Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes e os dados foram derivados da media das três determinações, cada uma em quatro replicatas. Os resultados foram expressos como número médio de células \pm SE e as diferenças entre o controle e as series de teste avaliadas por meio do teste-t de Student. A citotoxicidade da droga foi avaliada com base na extensão de inibição do crescimento celular. A inibição do crescimento celular pelas drogas testadas foi calculada como se segue:

30
$$\text{Inibição de crescimento celular \%} = \frac{\text{Controle} - \text{Série de testes}}{\text{Controle}} \times 100$$

Controle

[00091] Nas séries de controle, 4 µL de diferentes solventes utilizados para o teste das drogas foram adicionados às culturas como controles negativos do solvente. As diferenças entre essas séries de controle foram insignificantes; deste modo, uma média dos controles negativos foi aplicada nos cálculos.

[00092] Soluções de paclitaxel e docetaxel, bem como, suas formulações comerciais foram utilizadas como controles positivos. As diferenças da inibição de crescimento para essas drogas em diferentes solventes foram insignificantes; deste modo, uma média dos controles positivos foi aplicada nos cálculos.

[00093] A média $IC_{50} \pm SE$ foi calculada com base em pelo menos três experimentos separados.

[00094] Fatores de melhoramento (EF) foram calculados dividindo IC_{50} do controle da droga de comparação pelo IC_{50} da formulação inventiva.

[00095] A força iônica de uma solução é uma função da concentração de *todos* os íons presentes na solução.

$$I_c = \frac{1}{2} \sum_{B=1}^n c_B z_B^2$$

onde c_B é a concentração do íon B, z_B é o número de carga daquele íon, e o somatório é feito com todos os íons da solução.

Exemplo 1Preparação de Paclitaxel Amorfo

[00096] 12 ml de uma solução estoque de paclitaxel em metanol ($c=2,5$ mg/ml) e 2 ml de uma solução aquosa de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico ($c=15$ mg/ml) foram evaporadas a vácuo até a secura em um balão de fundo redondo de 50 ml. 15 ml de metanol foram adicionados ao balão e o resíduo foi dissolvido. A solução obtida foi evaporada até a secura. O filme obtido após a evaporação consistia de uma mistura de paclitaxel

amorfo e um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico.

Exemplo 2

Preparação de Docetaxel Amorfo

[00097] 27 ml de uma solução estoque de docetaxel em metanol
5 (c=0,5 mg/ml) e 1 ml de uma solução aquosa de um sal sódico de metil éster de
ácido N-todos-trans-retinoil cistéico (c=15 mg/ml) foram combinados em um balão
de fundo redondo de 100 ml. A solução obtida foi evaporada até a secura; o
resíduo foi dissolvido em 20 ml de metanol seguido de uma nova evaporação de
metanol a vácuo. O filme obtido após a evaporação consistia em uma mistura de
10 docetaxel amorfo e um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico.

Exemplo 3

Dissolução de Paclitaxel Amorfo em Solução Micelar de um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-Todos-Trans-Retinoil Cistéico

[00098] 13 ml de água e 2 ml de uma solução aquosa de um sal
15 sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico (c=15 mg/ml) foram
adicionados ao balão que contém o filme de paclitaxel amorfo preparado no
exemplo 1. O filme de paclitaxel foi completamente dissolvido por agitação suave
do vial por 10 min. A solução obtida era clara e transparente. Esta continha
paclitaxel dissolvido numa concentração de 2 mg/ml. Filtração da solução através
20 de um filtro de 0,2 µm não resultou em qualquer redução da concentração de pacli-
taxel.

Exemplo 4

Dissolução de Docetaxel Amorfo em Solução Aquosa de um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico

[00099] 24,4 ml de água foram adicionados ao docetaxel amorfo
25 obtido no exemplo 2, e a mistura foi agitada com um agitador magnético por 5
minutos. Então, 2,6 ml de uma solução aquosa de um sal sódico de metil éster de
ácido N-13-cis-retinoil cistéico (c=15 mg/ml) foram adicionados à suspensão e a
mistura foi agitada por 15 min. A solução obtida era clara e transparente. Esta
30 continha docetaxel dissolvido numa concentração de 0,5 mg/ml. Filtração da

solução através de um filtro de 0,2 µm não revelou em qualquer redução da concentração de paclitaxel.

Exemplo 5

Preparação de Formulação Aquosa de Paclitaxel pela Mistura em

Etapas da Solução Aquosa de uma Mistura de um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico e um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico e Solução de Metanol de Paclitaxel

[000100] 10 ml de uma solução de metanol de paclitaxel (10 mg/ml) foram adicionados gota a gota em um balão de fundo Redondo de 500 ml contendo 120 ml de uma solução aquosa de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico (2,5 mg/ml) e um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico (2,5 mg/ml) enquanto agitado por meio de um agitador magnético. Então o conteúdo do balão foi evaporado em um evaporador rotatório a 90 rpm e um banho a temperatura de 45oC até a pressão interno do sistema a vácuo fechado que consiste do balão, evaporador e uma bomba de vácuo cair para 7000 Pa (70 mbar). Tal adição da solução de paclitaxel em metanol como acima descrito seguida da evaporação foi repetida duas vezes. O volume total de solução de metanol adicionado foi de 30 ml. A solução aquosa remanescente após a evaporação foi transferida do balão para uma proveta de 250 ml. O balão foi lavado três vezes com 5 ml de água e as soluções de lavagem foram vertidas na proveta. Adicionou-se água às soluções combinadas para alcançar um volume total de 150 ml. A solução obtida foi filtrada através de um filtro de 0,2 µm e liofilizada. A concentração de paclitaxel na formulação obtida foi de 2 mg/ml.

Exemplo 6

Preparação da Formulação Aquosa de Docetaxel pela Mistura em Etapas da Solução Aquosa de um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico e uma Solução de Etanol de Docetaxel

[000101] 6 ml de uma solução de docetaxel (5 mg/ml) em etanol 95% foram gotejados em um balão de fundo Redondo contendo 100 ml uma solução aquosa de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil

cistéico (3 mg/ml) enquanto agitado por meio de um agitador magnético. A maior parte do etanol foi evaporada em um evaporador rotatório a 90 rpm e um banho a temperatura de 55°C até a pressão interna do sistema a vácuo fechado que consiste do balão, evaporador e uma bomba de vácuo cair para 6000 Pa (60 mbar). Tal adição da solução de docetaxel em etanol como acima descrito seguida da evaporação foi repetida duas vezes. O volume total de solução de metanol adicionado foi de 30 ml. A solução aquosa remanescente após a evaporação do etanol foi transferida do balão para uma proveta de 250 ml. O balão foi lavado três vezes com 5 ml de água e as soluções de lavagem foram vertidas na proveta. Adicionou-se água às soluções combinadas para alcançar um volume total de 150 ml. Após filtração através de um filtro de 0,2 µm, a formulação foi liofilizada. A concentração de docetaxel na formulação obtida foi de 1 mg/ml.

Exemplo 7

Preparação da Formulação Aquosa de Docetaxel pela Mistura da Solução Aquosa de um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico e um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico e Solução de Etanol de Docetaxel Durante a Evaporação.

Um balão de fundo Redondo de 1000 ml contendo 150 ml de uma solução aquosa de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico (3 mg/ml) e um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico (3 mg/ml) foi conectado a um evaporador rotatório equipado com uma tubulação de entrada para alimentação de soluções alcoólicas de taxanas de tal forma que a tubulação de entrada não entrou em contato com a solução aquosa. A evaporação iniciou com um banho a temperatura de 45°C e uma velocidade de rotação de 100 rpm. Após 1 min, a adição gota a gota (60 gotas/min ou 3 ml/min) de 80 ml de uma solução de metanol de docetaxel (5 mg/ml) foi iniciada. Após esta adição ter se completado, a evaporação foi continuada por 5 min. A solução aquosa remanescente após a evaporação de metanol foi transferida do balão de evaporação para uma proveta de 250 ml. O balão foi lavado três vezes com 10 ml

de água e as soluções de lavagem foram vertidas na proveta. Adicionou-se água às soluções combinadas para alcançar um volume total de 200 ml. Após filtração através de um filtro de 0,2 μm , a formulação foi liofilizada. A concentração de docetaxel na formulação obtida foi de 2 mg/ml. Exemplo 8

- 5 Investigação da Dependência do Tamanho da Partícula na Razão p/p de um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico/Paclitaxel em Formulações Formadas pela Reconstituição dos Resíduos Recentemente Evaporados de um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico e Paclitaxel com Solução Aquosa de Cloreto de Sódio na Concentração de
- 10 9 mg/ml.

Tabela 1

Razão p/p de sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico/paclitaxel	Concentração de Paclitaxel de 0,5 mg/ml		Concentração de Paclitaxel de 1 mg/ml		Concentração de Paclitaxel de 2 mg/ml		Concentração de Paclitaxel de 4 mg/ml	
	tamanho médio da partícula, nm	Desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	Desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	Desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	Desvio padrão
1,1	27,9	2,0	32,2	1,2	35,7	1,3	40,3	1,1
1,2	21,4	0,6	22,0	1,1	23,5	1,2	25,6	0,8
1,5	13,1	0,6	14,8	0,5	14,9	1,0	15,3	0,7
3,0	12,6	0,3	13,3	0,7	13,8	0,4	14,8	0,5
8,0	11,0	0,5	11,5	0,6	12,8	0,4	13,3	0,3

[000102] Como mostrado na Tabela 1 e Fig. 1 o tamanho da partícula diminui com a redução da quantidade de paclitaxel que é carregada nas micelas.

- 15 Exemplo 9

Investigação da Dependência do Tamanho da Partícula da

Formulação de Docetaxel sobre a Concentração de Cloreto de Sódio.

[000103] As soluções foram preparadas pela reconstituição do pó liofilizado contendo docetaxel e um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico na razão p/p 1:1.

5

Tabela 2

Concentração de NaCl, mg/ml	Concentração de docetaxel, 0,5mg/ml		Concentração de docetaxel, 1mg/ml		Concentração de docetaxel, 2mg/ml		Concentração de docetaxel, 4mg/ml	
	tamanho médio, nm	desvio padrão	tamanho médio, nm	desvio padrão	tamanho médio, nm	desvio padrão	tamanho médio, nm	desvio padrão
4	7,2	0,7	6,7	0,6	6,4	0,4	5,9	2,5
8	7,8	0,7	8,2	0,7	9,3	1,4	12,7	1,4
12	12,2	1,0	13,4	0,9	14,6	1,0	40,0	4,9
16	17,0	2,3	29,0	4,2	51,3	3,7	82,7	3,7
20	22,4	1,8	39,3	2,8	72,3	3,7	107,7	6,2
24	28,3	4,6	86,0	4,2	108,3	7,5	144,3	9,9

[000104] Como mostrado na Tabela 2 e Fig. 2 o aumento da concentração de cloreto de sódio, isto é, força iônica, torna as partículas maiores.

Exemplo 10

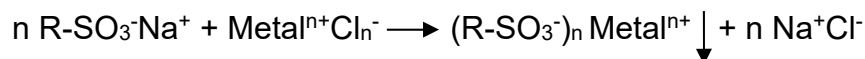
Transformação de um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico nos seus Sais de Cálcio.

10

[000105] Soluções aquosas de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico (5 ml, 15 mg/ml) e cloreto de cálcio (3 ml, 30 mg/ml) foram misturados em um tubo de ensaio de 10 ml. Durante a mistura, um precipitado fino emergiu. O precipitado foi separado por centrifugação do tubo de ensaio a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi agitado com 8 ml de água seguido de uma nova centrifugação. Após três procedimentos adicionais de lavagem como acima descrito, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm de modo a remover possíveis grandes

15

agregados do produto. A solubilidade do sal de cálcio de metil éster do ácido N-todos-trans-retinoil cistéico correspondeu a sua concentração na solução filtrada e foi igual a 0,2 mg/ml, conforme medido pelo método UV acima descrito. A reação é ilustrada pelo esquema geral abaixo envolvendo cloretos de quaisquer íons metálicos polivalentes, não apenas íons cálcio.



Sal sódico solúvel
em água de metil
éster de ácido N-
todos-trans-retinoil
cistéico

Sal sódico insolúvel em
água de metil éster de
ácido N-todos-trans-
retinoil cistéico ou metil
éster de ácido de N-13-
cis-retinoil cistéico com
metal polivalente

Exemplo 11

Investigação da Dependência do Tamanho da Partícula da Formulação de Paclitaxel sobre a Concentração de Cloreto de Cálcio.

[000106] As soluções foram preparadas pela reconstituição do pó liofilizado contendo paclitaxel, um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil-cistéico e um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico na razão p/p 1:1:1. Solventes para a reconstituição foram preparados pela dissolução de quantidades apropriadas de cloreto de cálcio diidratado em uma solução aquosa de cloreto de sódio com uma concentração de 9 mg/ml.

Tabela 3

Concentração de CaCl_2 , mmol/l	Concentração de Paclitaxel 0,5 mg/ml		Concentração de Paclitaxel 1 mg/ml		Concentração de Paclitaxel 2 mg/ml	
	tamanho médio da partícula, nm	desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	desvio padrão
0	12,7	0,4	16,3	1,1	22,1	0,2
2	23,8	1,7	24,6	0,5	27,3	0,2
4	27,4	0,2	30,1	0,4	32,0	0,1
6	51,0	0,6	55,2	5,1	58,6	1,6

[000107] Como mostrado na Tabela 3 e Figura. 3 o tamanho das partículas nas formulações aumenta quase linearmente com o aumento da concentração de CaCl_2 .

Exemplo 12

5 Curso Temporal do Tamanho da Partícula e do Potencial-Zeta da
Formulação Obtida pela Reconstituição da Mistura Liofilizada de Paclitaxel, um sal
sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico e um sal sódico de
metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico na razão p/p/p de 1:0,75:0,75 em
Solução Aquosa de Cloreto de Sódio (9 mg/ml), Cloreto de Cálcio (2 mmol/l) e
10 Cloreto de Magnésio (1 mmol/l)

Tabela 4

Tempo após reconstituição	Concentração de Paclitaxel 0,5 mg/ml		Concentração de Paclitaxel 1 mg/ml		Concentração de Paclitaxel 2 mg/ml	
	tamanho médio da partícula, nm	desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	desvio padrão
0	22,1	0,5	23,5	0,5	25,6	0,8
1	22,7	0,7	24,1	0,8	26,3	0,7
2	23,1	0,5	24,3	0,4	26,2	0,5
4	23	0,4	24,4	0,3	26,6	0,2
8	23,4	0,7	24,0	0,6	27,0	0,4

Tabela 5

Tempo após reconstituição	Concentração de Paclitaxel 0,5 mg/ml		Concentração de Paclitaxel 1 mg/ml		Concentração de Paclitaxel 2 mg/ml	
	Potencial-Zeta, mV	desvio padrão	Potencial-Zeta, mV	desvio padrão	tamanho Potencial-Zeta, mV	desvio padrão
0	-24,5	1,3	-28,7	1,2	-29,9	1,1

1	-26,3	1,8	-30,1	1,0	-32,7	0,8
2	-25,2	0,4	-30,4	1,0	-30,6	0,5
4	-27,0	0,5	-29,6	0,6	-31,2	0,3
8	-27,1	0,4	-30,4	0,3	-32,4	0,6

[000108] As tabelas 4 e 5, e as Figs. 4 e 5 mostram que não há qualquer mudança significativa nos valores do tamanho da partícula, bem como, do potencial-Zeta durante armazenagem da formulação por 8 horas.

Exemplo 13

5 Curso Temporal do Tamanho da Partícula e do Potencial-Zeta da Formulação Obtida pela Reconstituição da Mistura Liofilizada de Docetaxel e um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico na razão p/p de 1:2 em Solução Aquosa de Cloreto de Sódio (9 mg/ml) e Cloreto de Cálcio (3 mmol/l)

10 Tabela 6

Tempo após reconstituição	Concentração de Docetaxel 0,5 mg/ml		Concentração de Docetaxel 1 mg/ml		Concentração de Docetaxel 2 mg/ml	
	tamanho médio da partícula, nm	desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	desvio padrão
0	11,9	0,3	12,6	0,2	13,1	0,4
1	12,3	0,3	13,2	0,4	13,4	0,2
2	12,4	0,2	13,0	0,2	13,7	0,4
4	12,2	0,4	12,9	0,1	13,4	0,2
8	12,5	0,3	13,2	0,2	13,8	0,2

Tabela 7

Tempo após reconstituição	Concentração de Docetaxel 0,5 mg/ml		Concentração de Docetaxel 1 mg/ml		Concentração de Docetaxel 2 mg/ml	
	Potencial-Zeta,	desvio padrão	Potencial-Zeta,	desvio padrão	tamanho Potencial-Zeta,	desvio padrão

	mV		mV		Zeta, mV	
0	-22,2	2,1	-22,6	1,3	-22,8	0,6
1	-23,4	0,9	-22,4	1,2	-24,1	0,8
2	-22,7	0,4	-23,7	0,9	-23,3	0,4
4	-21,9	0,3	-23,1	0,8	-23,1	0,2
8	-21,7	0,6	-23,4	0,6	-23,5	0,5

[000109] As tabelas 6 e 7, e as Figs. 6 e 7 mostram que não há qualquer mudança significativa nos valores do tamanho da partícula, bem como, do potencial-Zeta durante armazenagem da formulação por 8 horas.

Exemplo 14

5 Preparação de Ciclosporina A Amorfa

[000110] 50 ml de uma solução estoque de Ciclosporina A em metanol (c=1,0 mg/ml) e 4,2 ml de uma solução aquosa de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico (c=12 mg/ml) foram evaporadas a vácuo até a secura em um balão de fundo redondo de 100 ml. 15 ml de metanol
10 foram adicionados ao balão e o resíduo foi dissolvido. A solução obtida foi evaporada até a secura. O filme obtido após a evaporação consistia de uma mistura de Ciclosporina A amorfa e um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico.

Exemplo 15

15 Dissolução de Ciclosporina A Amorfa em Solução Micelar de um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-Todos-Trans-Retinoil Cistéico

[000111] 45,8 ml de água e 4,2 ml de uma solução aquosa de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico (c=12 mg/ml) foram adicionados ao balão que contém o filme de Ciclosporina A amorfa preparada no
20 exemplo 14. O filme de Ciclosporina A foi completamente dissolvido por agitação suave do vial por 10 min. A solução obtida era clara e transparente. Esta continha Ciclosporina A dissolvida numa concentração de 1 mg/ml. Filtração da solução através de um filtro de 0,2 µm não resultou em qualquer redução da concentração

de Ciclosporina A.

Exemplo 16

Investigação da Dependência do Tamanho da Partícula na Razão p/p de um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil cistéico/Ciclosporina A em Formulações Formadas pela Reconstituição dos Resíduos Recentemente Evaporados de um Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil cistéico e Ciclosporina A com Solução Aquosa de Cloreto de Sódio na Concentração de 9 mg/ml.

Tabela 8

Razão p/p de sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico/Ciclosporina A	Concentração de Ciclosporina A de 0,5 mg/ml		Concentração de Ciclosporina A de 1 mg/ml		Concentração de Ciclosporina A de 2 mg/ml		Concentração de Ciclosporina A de 4 mg/ml	
	tamanho médio da partícula, nm	Desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	Desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	Desvio padrão	tamanho médio da partícula, nm	Desvio padrão
1,3	57,3	1,6	63,2	2,2	69,7	2,0	78,0	3,6
1,4	42,2	1,8	46,9	1,8	50,8	1,8	58,8	2,7
1,6	28,6	1,4	30,9	1,7	32,3	1,1	37,8	2,5
2,0	20,2	1,2	22,1	1,1	25,5	0,6	25,9	0,9
8,0	10,4	0,8	11,5	0,4	11,9	0,5	12,9	0,5

[000112] Como mostrado na Tabela 8 e Fig. 10 o tamanho da partícula diminui com a redução da quantidade de Ciclosporina A que é carregada nas micelas.

Avaliação Biológica – Exemplos 17 - 21

[000113] Experimentos *in vitro* mostraram que a atividade das formulações de taxana em diferentes linhagens de células de tumor sólido é mais expressada pelo uso de nanopartículas conforme fornecido pela presente

invenção. Além disso, a citotoxicidade dessas formulações depende dramaticamente do tamanho das nanopartículas. Tamanhos maiores de nanopartículas no sistema de liberação de droga inventiva conduzem ao decréscimo do transporte das taxanas em uma célula, o que por sua vez resulta na redução da citotoxicidade.

5 [000114] A atividade mais alta foi observada quando o tamanho foi de 25 e 13 nm para soluções de paclitaxel e docetaxel, respectivamente: experimentos *in vitro* geraram fatores de melhoramento para essas formulações de 41,7 e 31,7, respectivamente, no dia 3 de exposição. A amostra controle nesse experimento continha taxanas em soluções de etanol (sem quaisquer
10 nanopartículas).

[000115] Outras comparações *in vitro* de formulações de taxanas de acordo com a invenção com formulações de taxana comercialmente disponíveis mostraram que as formulações de acordo com a invenção apresentam uma atividade citotóxica mais expressada contra as diferentes linhagens de cultura de
15 células malignas, como adenocarcinoma de mama e câncer de pulmão de não-pequenas células.

Exemplo 17

Avaliação Comparativa da Citotoxicidade das Formulações Formadas pela Mistura de Docetaxel-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico (p/p/p = 1:1:1) em Culturas de Linhagens de Células de Adenocarcinoma Humano de Ovário SKOV3
20

[000116] O pó liofilizado consistia de docetaxel, um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico e um sal sódico de metil éster de
25 ácido N-13-cis-retinoil cistéico foi dissolvido tanto em etanol 70% quanto numa solução de cloreto de sódio (9 mg/ml) que contém uma quantidade apropriada de cloreto de cálcio. Amostras das soluções obtidas foram tomadas e utilizadas para a determinação do tamanho médio da partícula.

Tabela 9

Solvent	Concentração	Tamanho	Dia 3	EF*	Dia 4	EF*	Dia 5	EF*
---------	--------------	---------	-------	-----	-------	-----	-------	-----

e	ão de	o da	IC ₅₀	dia 3	IC ₅₀	dia	IC ₅₀	dia 5
	CaCl ₂ , mmol/l	Partícula, nm				4		
EtOH 70%	-	-	$2,0 \cdot 10^{-7}$	-	$7,2 \cdot 10^{-9}$	-	$7,6 \cdot 10^{-10}$	-
solução NaCl	0	11,3	$1,2 \cdot 10^{-7}$	1,7	$7,2 \cdot 10^{-9}$	1	$6,5 \cdot 10^{-10}$	1,2
solução NaCl	1	12,2	$3,4 \cdot 10^{-8}$	5,9	$5,6 \cdot 10^{-9}$	1,3	$4,2 \cdot 10^{-10}$	1,8
solução NaCl	2	13,1	$6,3 \cdot 10^{-9}$	31,7	$2,1 \cdot 10^{-9}$	3,4	$9,4 \cdot 10^{-11}$	8,1
solução NaCl	3	14,6	$2,0 \cdot 10^{-8}$	10	$3,4 \cdot 10^{-9}$	2,1	$1,4 \cdot 10^{-10}$	5,4

*A formulação com etanol foi utilizada como controle positivo para cálculo de EF.

[000117] A Tabela 9 e Fig. 8 mostram que a formulação contendo 2 mmol/l de cálcio é a mais ativa. Portanto, o aumento e o decréscimo da concentração de cálcio reduzem a citotoxicidade das formulações.

Exemplo 18

Avaliação Comparativa da Citotoxicidade das Formulações Formadas pela Mistura de Paclitaxel-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico (p/p/p = 1:0,75:0,75) em Culturas de Linhagens de Células de Adenocarcinoma Humano de Ovário SKOV3

[000118] O pó liofilizado consistindo em paclitaxel, um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico e um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico foi dissolvido tanto em etanol 70% quanto numa solução de cloreto de sódio (9 mg/ml) que contém uma quantidade apropriada de cloreto de cálcio. Amostras das soluções obtidas foram tomadas e utilizadas para a determinação do tamanho médio da partícula.

Tabela 10

Solvente	Concentração de CaCl_2 , mmol/l	Tamanho da Partícula, nm	Dia 3 IC_{50}	EF* dia 3	Dia 4 IC_{50}	EF* dia 4	Dia 5 IC_{50}	EF* dia 5
EtOH 70%	-	-	$5,0 \cdot 10^{-6}$	-	$2,1 \cdot 10^{-7}$	-	$6,8 \cdot 10^{-8}$	-
solução NaCl	0	17	$3,0 \cdot 10^{-6}$	1,7	$1,3 \cdot 10^{-7}$	1,6	$5,5 \cdot 10^{-8}$	1,2
solução NaCl	1	19	$1,7 \cdot 10^{-6}$	2,9	$8,4 \cdot 10^{-8}$	2,5	$9,8 \cdot 10^{-9}$	6,9
solução NaCl	2	25	$1,2 \cdot 10^{-7}$	41,7	$2,3 \cdot 10^{-8}$	9,1	$7,2 \cdot 10^{-10}$	94,0
solução NaCl	3	29	$2,4 \cdot 10^{-7}$	20,8	$4,3 \cdot 10^{-8}$	4,9	$1,2 \cdot 10^{-8}$	5,7

* A formulação com etanol foi usada como controle positivo para cálculo de EF

[000119] A Tabela 10 e Fig. 9 mostram que a formulação contendo 2 mmol/l de cálcio é a mais ativa. Portanto, o aumento e o decréscimo da concentração de cálcio reduzem a citotoxicidade das formulações.

Exemplo 19

Avaliação da Citotoxicidade da Formulação "Paclitaxel-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico (p/p/p = 1:0,75:0,75) com TAXOL®, ABRAXANE® e Paclitaxel sozinho em Culturas de Linhagens de Células de Adenocarcinoma Humano de Mama MDA-MB-231

[000120] A formulação do título foi preparada pela dissolução do pó liofilizado em uma solução aquosa contendo cloreto de sódio (6 mg/ml), cloreto de potássio (0,3 mg/ml), cloreto de cálcio hexaidratado (0,4 mg/ml), lactato de sódio (3,1 mg/ml). Paclitaxel foi usado em uma solução de metanol. Amostras de TAXOL® e ABRAXANE® foram preparadas de acordo com as instruções dos

fabricantes por diluição de TAXOL® concentrado comercialmente disponível (6 mg/ml) em solução de cloreto de sódio (9 mg/ml) e pela reconstituição do paclitaxel ligado a albumina liofilizado com solução de cloreto de sódio (9 mg/ml) até uma concentração de paclitaxel de 5 mg/ml. Todas as amostras foram utilizadas dentro de uma hora após preparo. Os efeitos de melhoramento foram calculados versus solução de metanol de paclitaxel. Os resultados estão listados na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11

Formulação	Tamanho da Partícula, nm	Dia 3 IC ₅₀	EF* dia 3	Dia 4 IC ₅₀	EF* dia 4
Paclitaxel	-	$(3,8 \pm 0,15) \times 10^{-8}$	-	$(3,4 \pm 0,12) \times 10^{-8}$	-
TAXOL®	-	$(2,04 \pm 0,05) \times 10^{-8}$	1,9	$(2,0 \pm 0,10) \times 10^{-8}$	1,7
ABRAXANE®	130	$(4,2 \pm 0,09) \times 10^{-8}$	0,9	$(3,4 \pm 0,16) \times 10^{-8}$	1
Paclitaxel-sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico-sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico	24	$(4,2 \pm 0,14) \times 10^{-9}$	4,9	$(3,2 \pm 0,09) \times 10^{-9}$	10,6

Exemplo 20Avaliação da Citotoxicidade da Formulação “Docetaxel-Sal Sódico de

10 Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de

Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico (p/p/p = 1:0,5:0,5) com TAXOTERE® e Docetaxel sozinho em Culturas de Linhagens de Células de Adenocarcinoma Humano de Mama MDA-MB-231

[000121] A formulação do título foi preparada pela dissolução do pó liofilizado em uma solução aquosa contendo cloreto de sódio (6 mg/ml), cloreto de potássio (0,3 mg/ml), cloreto de cálcio hexaidratado (0,4 mg/ml), lactato de sódio (3,1 mg/ml). Docetaxel foi usado em uma solução de metanol. Amostras de TAXOTERE® foram preparadas de acordo com as instruções dos fabricantes por diluição de um concentrado comercialmente disponível (40 mg/ml) primeiramente com solução de etanol até 10 mg/ml seguido de diluição adicional em solução de cloreto de sódio (9 mg/ml). Todas as amostras foram utilizadas dentro de uma hora após preparo. Os efeitos de melhoramento foram calculados versus solução de metanol de docetaxel. Os resultados estão listados na Tabela 12 abaixo.

Tabela 12

Formulação	Tamanho da Partícula, nm	Dia 3 IC ₅₀	EF* dia 3	Dia 4 IC ₅₀	EF* dia 4
Docetaxel	-	$(1,25 \pm 0,11) \times 10^{-8}$	-	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-8}$	-
TAXOTERE®	-	$(1,08 \pm 0,09) \times 10^{-8}$	1,2	$(9,60 \pm 0,18) \times 10^{-9}$	1,0
Docetaxel-sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico-sal sódico de	12	$(3,1 \pm 0,1) \times 10^{-9}$	4,0	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-9}$	8,3

metil éster de ácido N-13- cis-retinoil cistéico					
---	--	--	--	--	--

Exemplo 21

- Avaliação da Citotoxicidade da Formulação “Paclitaxel-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico (p/p/p = 1:0,75:0,75) com TAXOL[®], ABRAXANE[®] e Paclitaxel sozinho em Culturas de Linhagens de Células de Adenocarcinoma Humano de Ovário SKOV3

- [000122] A formulação do título foi preparada pela dissolução do pó liofilizado em uma solução aquosa contendo cloreto de sódio (6 mg/ml), cloreto de potássio (0,3 mg/ml), cloreto de cálcio hexaidratado (0,4 mg/ml), lactato de sódio (3,1 mg/ml). Paclitaxel foi usado em uma solução de metanol. Amostras de TAXOL[®] e ABRAXANE[®] foram preparadas de acordo com as instruções dos fabricantes por diluição de TAXOL[®] concentrado comercialmente disponível (6 mg/ml) em solução de cloreto de sódio (9 mg/ml) e pela reconstituição do paclitaxel ligado a albumina liofilizado com solução de cloreto de sódio (9 mg/ml) até uma concentração de paclitaxel de 5 mg/ml. Todas as amostras foram utilizadas dentro de uma hora após preparo. Os efeitos de melhoramento foram calculados versus solução de metanol de paclitaxel. Os resultados estão listados na Tabela 13 abaixo.

Tabela 13

Formulação	Tamanho da Partícula, nm	Dia 3 IC ₅₀	EF* dia 3	Dia 4 IC ₅₀	EF* dia 4
Paclitaxel	-	$(5,94 \pm 0,21) \times 10^{-7}$	-	$(6,22 \pm 0,18) \times 10^{-8}$	-
TAXOL [®]	-	$(3,24 \pm 0,16) \times 10^{-7}$	1,8	$(4,20 \pm 0,25) \times 10^{-8}$	1,5

		7		10 ⁻⁸	
ABRAXANE®	130	$(6,3 \pm 0,32) \times 10^{-7}$	0,94	$(6,5 \pm 0,30) \times 10^{-8}$	0,96
Paclitaxel-sal sódico de metil éster de ácido N- todos-trans- retinoil cistéico-sal sódico de metil éster de ácido N-13- cis-retinoil cistéico	24	$(2,05 \pm 0,08) \times 10^{-7}$	2,3	$(2,17 \pm 0,15) \times 10^{-8}$	2,9

Exemplo 22

Avaliação da Citotoxicidade da Formulação “Docetaxel-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico (p/p/p = 1:0,5:0,5) com TAXOTERE® e Docetaxel sozinho em Culturas de Linhagens de Células de Adenocarcinoma Humano de Ovário SKOV-3

[000123] A formulação do título foi preparada pela dissolução do pó liofilizado em uma solução aquosa contendo cloreto de sódio (6 mg/ml), cloreto de potássio (0,3 mg/ml), cloreto de cálcio hexaidratado (0,4 mg/ml), lactato de sódio (3,1 mg/ml). Docetaxel foi usado em uma solução de metanol. Amostras de TAXOTERE® foram preparadas de acordo com as instruções dos fabricantes por diluição de um concentrado comercialmente disponível (40 mg/ml) primeiramente com solução de etanol até 10 mg/ml seguido de diluição adicional em solução de cloreto de sódio (9 mg/ml). Todas as amostras foram utilizadas dentro de uma hora após preparo. Os efeitos de melhoramento foram calculados versus solução de metanol de docetaxel. Os resultados estão listados na Tabela 14 abaixo.

Tabela 14

Formulação	Tamanho da Partícula, nm	Dia 3 IC ₅₀	EF* dia 3	Dia 4 IC ₅₀	EF* dia 4
Docetaxel	-	$(9,07 \pm 0,38) \times 10^{-8}$	-	$(2,85 \pm 0,26) \times 10^{-8}$	-
TAXOTERE®	-	$(1,18 \pm 0,09) \times 10^{-7}$	0,8	$(2,03 \pm 0,15) \times 10^{-8}$	1,4
Docetaxel-sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico-sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico	12	$(3,24 \pm 0,18) \times 10^{-8}$	2,8	$(2,86 \pm 0,13) \times 10^{-9}$	10,0

Exemplo 23

Avaliação da Citotoxicidade da Formulação “Paclitaxel-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico (p/p/p = 1:0,75:0,75) com TAXOL®, ABRAXANE® e Paclitaxel sozinho em Culturas de Linhagens de Células de Câncer de Pulmão Não-Pequeñas A549

[000124] A formulação do título foi preparada pela dissolução do pó liofilizado em uma solução aquosa contendo cloreto de sódio (6 mg/ml), cloreto de potássio (0,3 mg/ml), cloreto de cálcio hexaidratado (0,4 mg/ml), lactato de

sódio (3,1 mg/ml). Paclitaxel foi usado em uma solução de metanol. Amostras de TAXOL® e ABRAXANE® foram preparadas de acordo com as instruções dos fabricantes por diluição de TAXOL® concentrado comercialmente disponível (6 mg/ml) em solução de cloreto de sódio (9 mg/ml) e pela reconstituição do paclitaxel ligado a albumina liofilizado com solução de cloreto de sódio (9 mg/ml) até uma concentração de paclitaxel de 5 mg/ml. Todas as amostras foram utilizadas dentro de uma hora após preparo. Os efeitos de melhoramento foram calculados versus solução de metanol de paclitaxel. Os resultados estão listados na Tabela 15 abaixo.

10

Tabela 15

Formulação	Tamanho da Partícula, nm	Dia 3 IC ₅₀	EF* dia 3	Dia 4 IC ₅₀	EF* dia 4
Paclitaxel	-	$(8,02 \pm 0,11) \times 10^{-9}$	-	$(5,28 \pm 0,13) \times 10^{-9}$	-
TAXOL®	-	$(6,49 \pm 0,08) \times 10^{-9}$	1,2	$(3,77 \pm 0,09) \times 10^{-9}$	1,4
ABRAXANE®	130	$(1,2 \pm 0,06) \times 10^{-8}$	0,67	$(5,2 \pm 0,15) \times 10^{-9}$	1
Paclitaxel-sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico-sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil	24	$(1,61 \pm 0,11) \times 10^{-9}$	5,0	$(7,02 \pm 0,12) \times 10^{-10}$	2,9

cistéico					
----------	--	--	--	--	--

Exemplo 24

Avaliação da Citotoxicidade da Formulação “Docetaxel-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico (p/p/p = 1:0,5:0,5) com TAXOTERE® e Docetaxel sozinho em Culturas de Linhagens de Células de Adenocarcinoma Humano de Ovário SKOV-3

[000125] A formulação do título foi preparada pela dissolução do pó liofilizado em uma solução aquosa contendo cloreto de sódio (6 mg/ml), cloreto de potássio (0,3 mg/ml), cloreto de cálcio hexaidratado (0,4 mg/ml), lactato de sódio (3,1 mg/ml). Docetaxel foi usado em uma solução de metanol. Amostras de TAXOTERE® foram preparadas de acordo com as instruções dos fabricantes por diluição de um concentrado comercialmente disponível (40 mg/ml) primeiramente com solução de etanol até 10 mg/ml seguido de diluição adicional em solução de cloreto de sódio (9 mg/ml). Todas as amostras foram utilizadas dentro de uma hora após preparo. Os efeitos de melhoramento foram calculados versus solução de metanol de docetaxel. Os resultados estão listados na Tabela 16 abaixo.

Tabela 16

Formulação	Tamanho da Partícula, nm	Dia 3 IC ₅₀	EF* dia 3	Dia 4 IC ₅₀	EF* dia 4
Docetaxel	-	$(5,76 \pm 0,26) \times 10^{-9}$	-	$(4,97 \pm 0,27) \times 10^{-9}$	-
TAXOTERE®	-	$(4,81 \pm 0,34) \times 10^{-9}$	1,2	$(4,63 \pm 0,17) \times 10^{-9}$	1,1
Docetaxel-sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil	12	$(9,14 \pm 0,47) \times 10^{-10}$	6,3	$(5,35 \pm 0,15) \times 10^{-10}$	7,9

cistéico-sal sódico de metil éster de ácido N-13- cis-retinoil cistéico					
--	--	--	--	--	--

Exemplo 25: Um Estudo de Um Mês da Toxicidade da Formulação

“Paclitaxel-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico (p/p/p = 1:0,75:0,75)” em Ratos

- 5 [000126] A formulação testada foi preparada pela reconstituição em soro fisiológico da mistura liofilizada de Paclitaxel-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico (p/p/p = 1:0,75:0,75). 80 ratos Wistar (BRLHan:Wist@Mol (GALAS)), 40 machos e 40 fêmeas, foram divididos em 4 grupos com 10 machos e
- 10 10 fêmeas em cada. As formulações testadas foram administradas por injeção intravenosa uma vez por semana por 5 semanas. O Grupo 1 recebeu soro fisiológico e funcionou como controle, o Grupo 2 recebeu 5 mg/kg da formulação de paclitaxel com óleo de rícino polioxetilado, o Grupo 3 recebeu 5 mg/kg da formulação do título, e o Grupo 4 recebeu 10 mg/kg da formulação do título.
- 15 Originalmente, o estudo foi concebido de modo que o Grupo 2 recebesse 10 mg/kg de Taxol® como comparação direta com o Grupo 4, contudo, devido a mortalidade, esta dosagem foi reduzida para 5 mg/kg, tal que a comparação direta com o Grupo 3 foi mais apropriada. Houve 8 mortes durante o estudo. Sete ratos que receberam 10 mg/kg de Taxol® morreram logo após a primeira dose. Cinco desses ratos
- 20 foram substituídos por sobressalentes, e a dose foi reduzida para 5 mg/kg. Os valores médios para as fêmeas dos Grupos 2, 3 e 4 dos parâmetros de células vermelhas do sangue (Hb, RBC e HT) foram mais baixos do que os dos controles. Embora uma mudança similar não tenha sido vista nos machos, os valores para os índices de células vermelhas MCV nos machos do Grupo 2 foram elevados. Os

valores médios para as células brancas do sangue, particularmente neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e nos machos, monócitos nos animais tratados foram mais baixos do que os dos controles. Os valores médios de bilirrubina soro para os machos do Grupo 4 e as fêmeas dos Grupos 2 e 4 foram maiores do que os dos controles. A bilirrubina das fêmeas do Grupo 2 (Taxol®) foi significativamente maior do que das fêmeas do Grupo 3. O peso do fígado dos machos dos Grupos 2 e 4 foi significativamente menor do que o dos controles. O peso do timo dos machos e das fêmeas do Grupo 4 e dos machos do Grupo 2 foi significativamente menor do que do controle. Relativamente alta incidência de mínima ou leve atrofia linfóide foi registrada no baço, o nódulo linfático mesentérico e mandibular do Grupo 4. Baixa incidência de mínima ou leve atrofia linfóide foi registrada nos nódulos linfáticos mesentérico e mandibular do Grupo 2. Mínima ou levemente aumentada linfocitólise cortical foi registrada nos machos do Grupo 2. Na glândula mamária dos machos dos Grupos 2 e 4, uma maior incidência de mínimo decréscimo de vacúolos secretores/hipoplasia de alvéolo multifocal foi registrada em comparação com o controle e o Grupo 3. Aumentada incidência de figuras mitóticas/corpos apoptóticos na camada epitelial da glândula mamária foi registrada em aproximadamente metade dos machos de todos os grupos tratados.

[000127] Este exemplo demonstra que a formulação em nanopartícula de “Paclitaxel-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico (p/p/p = 1:0,75:0,75)” possui uma toxicidade mais baixa quando comparado com concentrações idênticas da formulação convencional de paclitaxel com óleo de rícino polioxietilado.

Exemplo 26

[000128] Vantagens da formulação de nanopartícula de “Paclitaxel-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal Sódico de Metil Éster de Ácido N-13-cis-retinoil Cistéico” quando comparado com a formulação convencional de paclitaxel com óleo de rícino polioxietilado (Taxol®). Os resultados principais e conclusões estão resumidos na tabela 17 abaixo.

[000129] Tabela 17. Comparação de formulações de paclitaxel (resultados e considerações para a formulação título de acordo com um estudo de tratamento de 34 pacientes com doenças com tumores malignos sólidos histologicamente comprovadas, para os quais nenhuma terapia padrão estava disponível ou tinha falhado; informações sobre Taxol® de acordo com BMS PI Rev. Julho 2007)

	Paclitaxel-Sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil Cistéico-Sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil Cistéico	Paclitaxel-óleo de rícino polioxietilado
Nível de dose/m ²	250	175
Premedicamento com esteróides, antieméticos e antihistamínicos	Nada	Sim
Anafilaxia e graves reações de hipersensibilidade	Nada (sem premedicamento)	5% (todos os pacientes receberam premedicamento)
tempo de infusão	1 hora	3 horas

[000130] Embora a invenção tenha sido descrita com relação a algumas realizações, incluindo o melhor modo de realização atualmente conhecido pelos inventores, deve-se compreender que várias alterações e modificações, como ficarão óbvias para uma pessoa versada na arte, podem ser feitas sem sair do escopo da invenção conforme estabelecido nas reivindicações aqui anexadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema de liberação de droga para administração de pelo menos uma substância farmacologicamente ativa que apresenta uma solubilidade per se em água menor do que 100 µg/ml em 15 a 38°C, o dito sistema de liberação de droga compreendendo nanopartículas, as ditas nanopartículas compreendendo a substância farmacologicamente ativa, a substância farmacologicamente ativa estando na forma particulada com pelo menos 90% das nanopartículas com um diâmetro médio Z inferior a 50 nm quando medido por espalhamento de luz dinâmico com o uso de laser vermelho com um comprimento de onda de 633 nm , **CARACTERIZADO** por:

- as partículas da substância farmacologicamente ativa serem não-cristalinas ou consistirem em cristais com um tamanho de partícula de 10 nm ou menos;

- as partículas da substância farmacologicamente ativa estão aprisionadas em nanopartículas formadas por um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses; e

- a razão peso-por-peso do dito sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses, para a dita substância estando na faixa de 0,5:1 a 20:1.

2. Sistema de liberação de droga de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pela razão peso-por-peso do dito sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses, para a dita substância estando na faixa de 1:1 a 10:1.

3. Sistema de liberação de droga de acordo com as reivindicações 1 e 2, **CARACTERIZADO** pela dita substância ser um composto citotóxico ou citostático.

4. Sistema de liberação de droga de acordo com a reivindicação

3, **CARACTERIZADO** pelo dito composto citotóxico ou citostático ser uma taxana.

5. Sistema de liberação de droga de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pela dita taxana ser selecionada entre paclitaxel e docetaxel.

6. Sistema de liberação de droga de acordo com as reivindicações 3 a 5, **CARACTERIZADO** por ser usado no tratamento de câncer.

7. Sistema de liberação de droga de acordo com as reivindicações 1 a 2, **CARACTERIZADO** pela dita substância ser um imunossupressor.

8. Sistema de liberação de droga de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo dito imunossupressor ser selecionado entre ciclosporina, sirolimus e tacrolimus.

9. Sistema de liberação de droga de acordo com as reivindicações 7 a 8, **CARACTERIZADO** por ser usado em transplante de órgão pós-alogênico.

10. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** por compreender um carreador farmacêuticamente aceitável e o sistema de liberação de droga conforme definido nas reivindicações 1 a 5, 7 e 8.

11. Uso de um sal sódico de metil éster de ácido N-todos-trans-retinoil cistéico, um sal sódico de metil éster de ácido N-13-cis-retinoil cistéico, ou uma combinação desses, na preparação de um sistema de liberação de droga conforme definido nas reivindicações 1–5, 7 e 8.

12. Uso de um sistema de liberação de droga conforme definido nas reivindicações 3 a 5, **CARACTERIZADO** por ser usado na preparação de um medicamento para o tratamento de câncer.

13. Uso de um sistema de liberação de droga conforme definido nas reivindicações 7 a 8, **CARACTERIZADO** por ser usado na preparação de um medicamento para uso no transplante de órgão pós-alogênico.

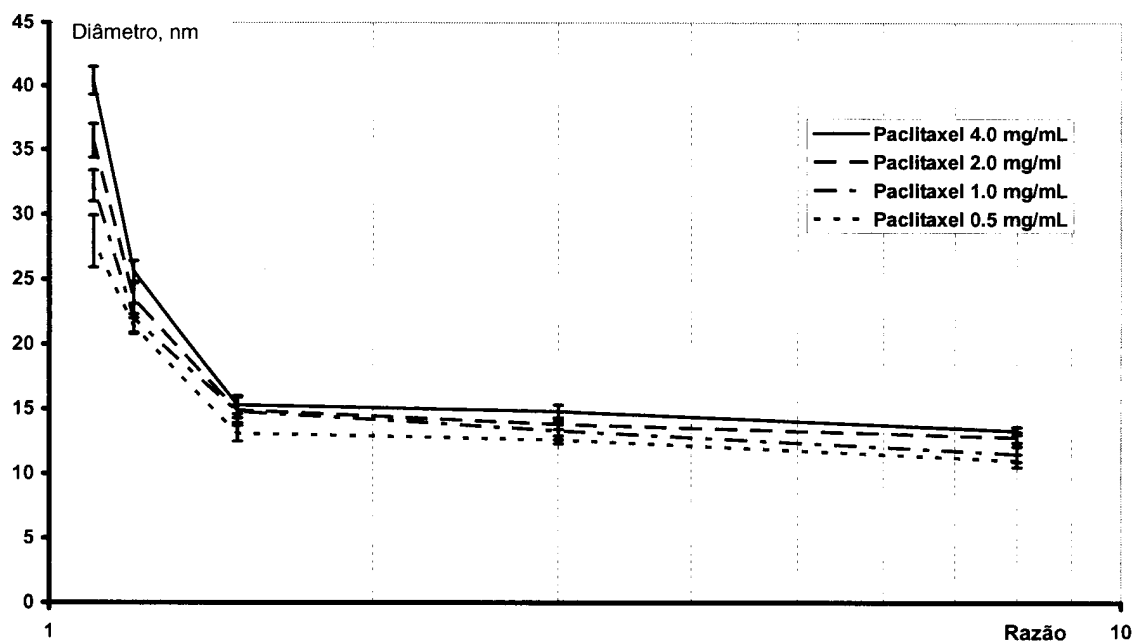


Fig. 1

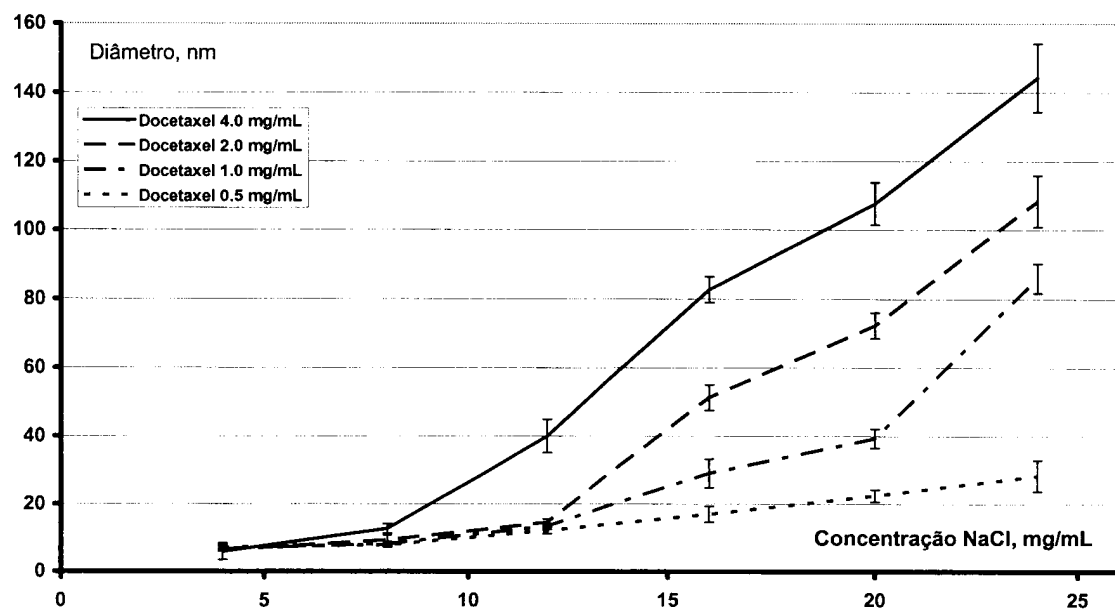


Fig. 2

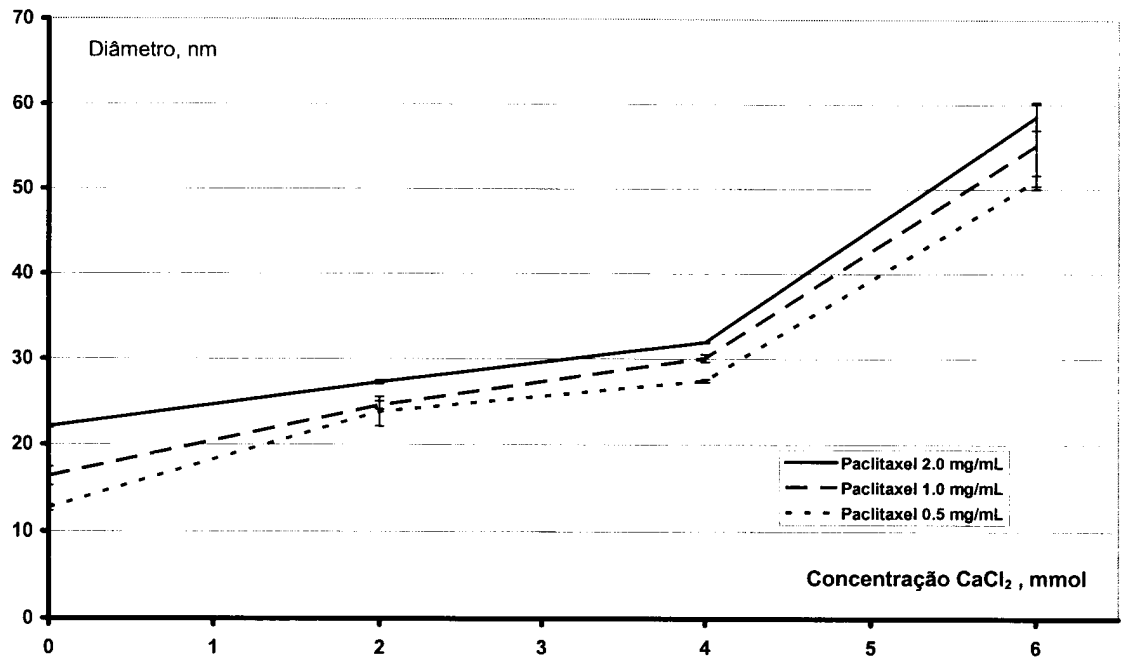


Fig. 3

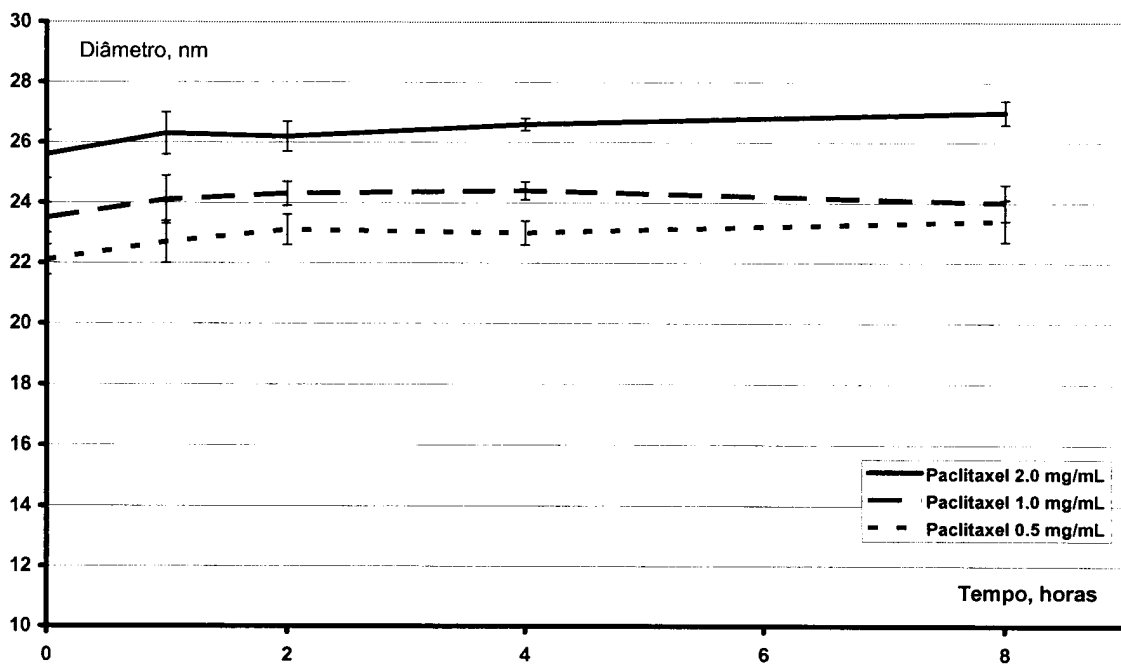


Fig. 4

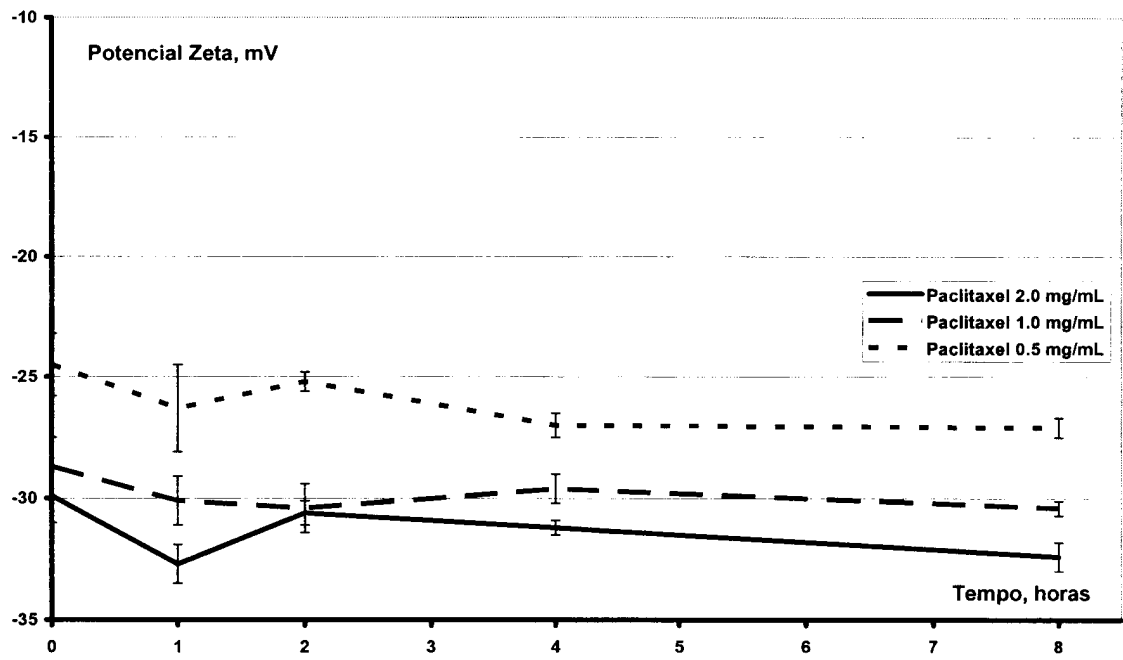


Fig. 5

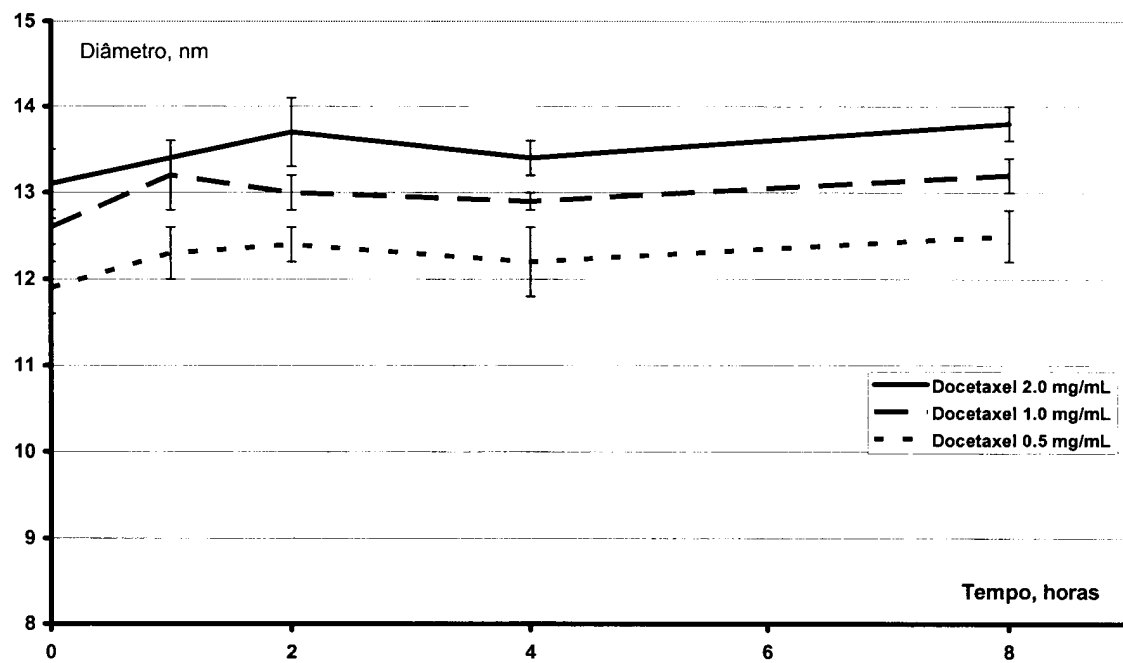


Fig. 6

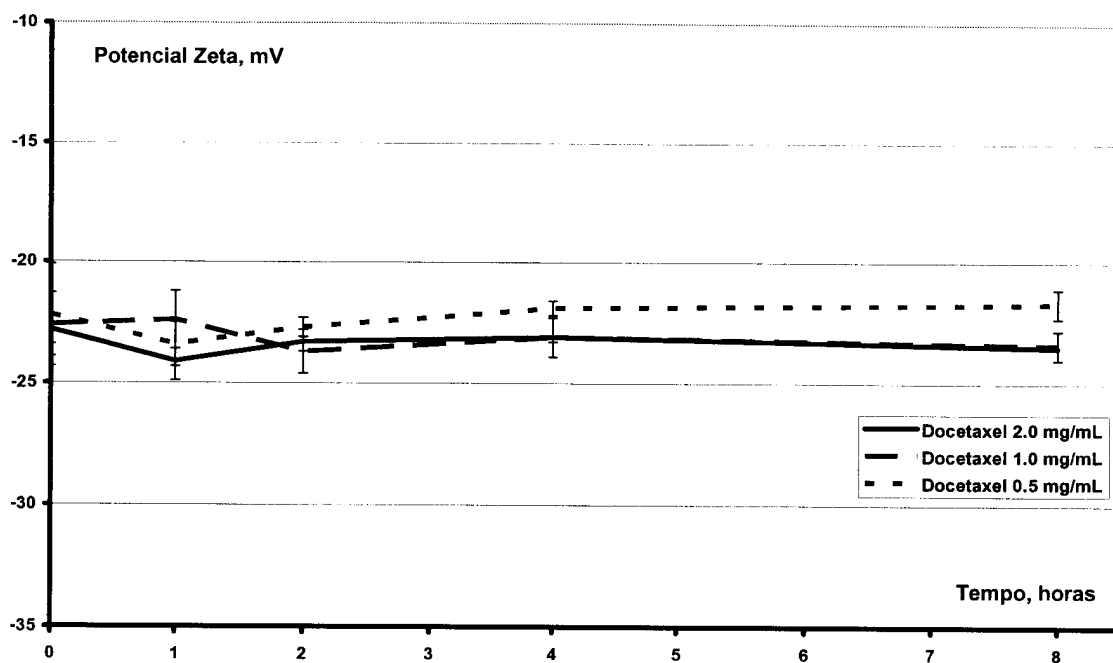


Fig. 7

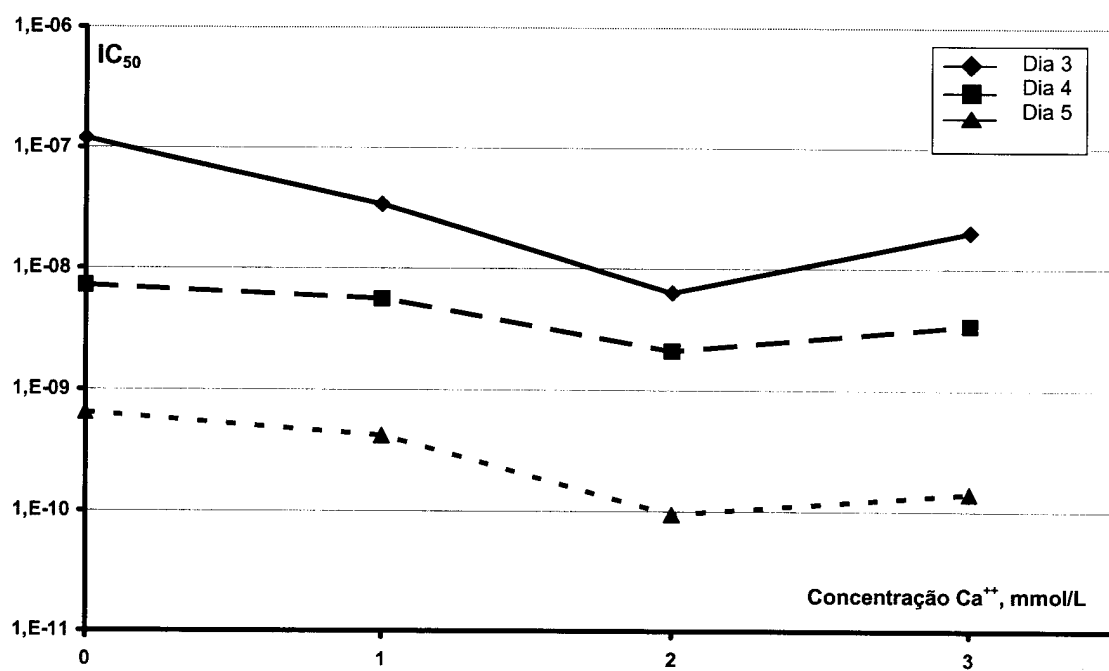


Fig. 8

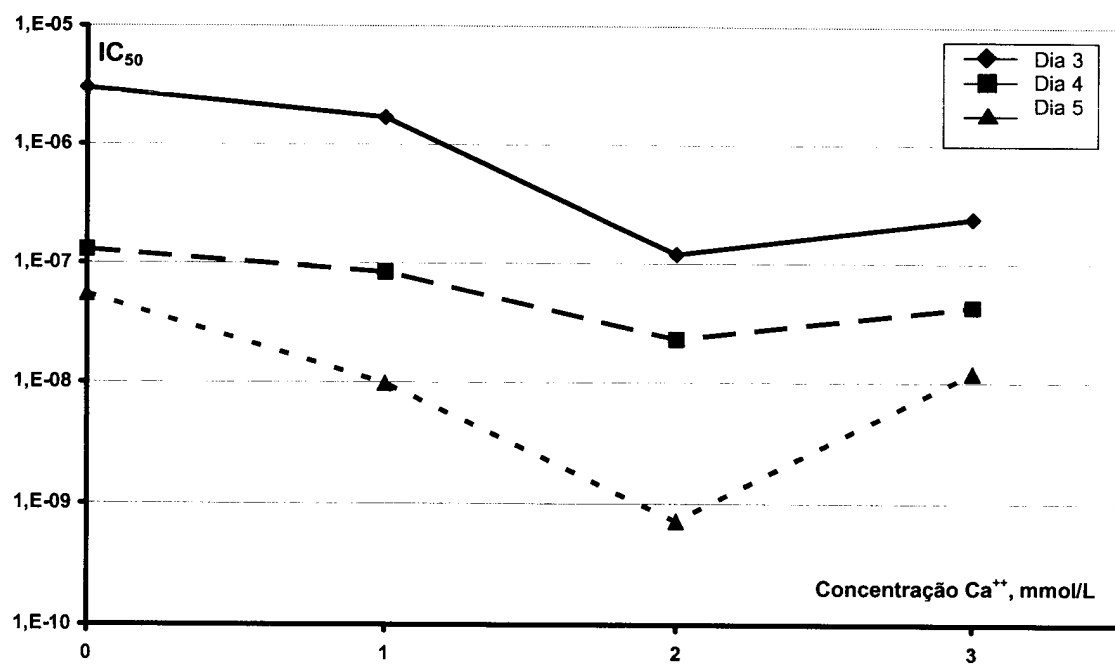


Fig. 9

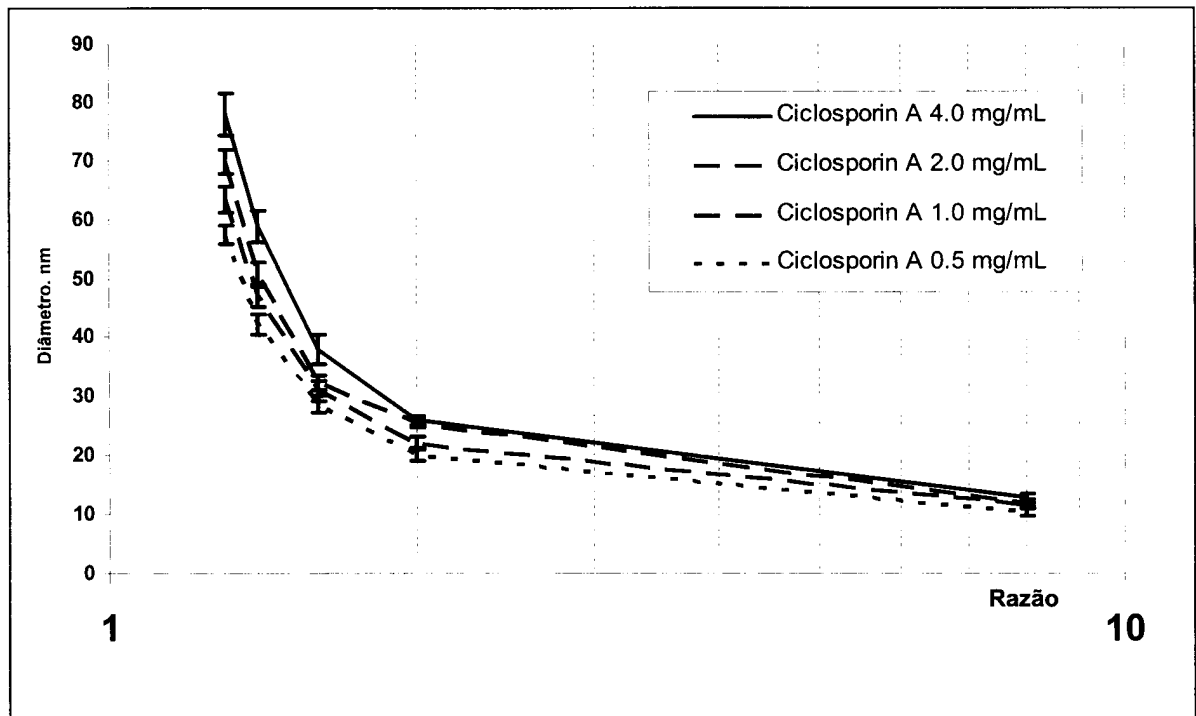


Fig. 10