

P. 7. n° 86.805

4.

CLAYTON FOUNDATION FOR RESEARCH.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMA-
CÊUTICAS CONTENDO PRINCÍPIOS ACTIVOS ENCAPSU-
LADOS NA PRESENÇA DE UM CLORIDRATO EM LI-
POSOMAS MULTIVESICULARES"

Campo da Invenção:

) A presente invenção diz respeito a liposomas ou vesícu-
las de lípidos multivesiculares sintéticas que incorporam subs-
tâncias activas, sob o ponto de vista biológico, e a processos
para a sua preparação.

Antecedentes da Invenção:

) Os liposomas multivesiculares são um dos três tipos
principais de liposomas, preparados em primeiro lugar por Kim
et al. (1983, Biochim. Biophys. Acta 782, 339-348) e são sin-
gularmente diferentes dos unilamelares (Huang, 1969, Bioche-
mistry 8, 334-352; Kim et al., 1981, Biochim. Biophys. Acta 646,
1-10) e dos multilamelares (Bangham et al., 1965, J. Mol. Bio.
13, 238-252), liposomas em que há múltiplos compartimentos
aquosos, não concêntricos, no seu interior. A técnica anterior
descreve um número de processos para a produção de liposso-
mas, mas todas estas técnicas dizem respeito à produção de
liposomas não-multivesiculares; por exemplo, patente de in-
venção norte-americana Nº. 4.522.803 de Lenk; Nº 4.310-506
de Baldschwieler; Nº 4.235.871 de Papahadjopoulos;
Nº 4.394.372 de Taylor; Nº 4.308.166 de Marchetti; Nº 4.485.054

de Mezei; Nº 4.508.703 de Redziniak; Nº 4.224.179 de Schneider; e Nº 4.078,052 de Papahadjopoulos, todas descrevem vesículas não-multivesiculares. Para uma revisão compreensível dos vários métodos de preparação de lipossomas, referimos Szoka et al., 1980, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467-508.

O método de Kim et al., (1983, Biochim. Biophys. Acta 782, 339-348) é a única informação que descreve os lipossomas multivesiculares, mas a eficiência de encapsulação do soma de algumas das moléculas pequenas, tal como ara-C, foi relativamente baixa e a velocidade de libertação de moléculas encapsuladas em fluido biológico, foi elevada.

O tratamento óptimo com muitos medicamentos necessita da manutenção de um nível de medicamento durante um período prolongado de tempo. Por exemplo, o tratamento anti-canceroso óptimo com antimetabolitos celulares ciclo-específicos necessita da manutenção de um nível de medicamento citotóxico durante um período prolongado de tempo. A citarabina é um medicamento anti-canceroso altamente subordinado a um horário. Devido ao facto deste medicamento destruir as células, apenas quando estas preparam o ADN, necessita-se de uma exposição prolongada à concentração terapêutica do medicamento para uma destruição celular óptima. Infelizmente a semi-vida da citarabina, após uma dose intravenosa (IV) ou subcutânea (SC), é muito curta. Para se obter uma destruição óptima das células cancerosas com um medicamento de fase cíclica celular específica, como a citarabina, necessita-se de se encontrar duas condições principais: em primeiro lugar, deve expor-se o cancro a uma alta concentração do medicamento sem produ

zir danos irreversíveis no hospedeiro; em segundo lugar deve expor-se o tumor durante um período prolongado de tempo, de maneira que todas ou a maioria das células cancerosas tenham tentado sintetizar o ADN, na presença da citarabina.

Antes da presente invenção, o único processo de se obter células de plasma prolongado era através de infusão contínua (IV) ou (SC), as quais são inconvenientes e dispendiosas. Por conseguinte, necessita-se de uma preparação "depot" destes medicamentos com libertação lenta, aceitável. No passado, os investigadores tentaram realizar isto por meio da modificação química das moléculas dos medicamentos para retardar o metabolismo ou da ligação covalente de um grupo hidrófobo para atrasar a solubilização. Tais manipulações originaram novos efeitos tóxicos, Finkelstein et al., Cancer Treat Rep 63:1331-1333, 1979, ou problemas farmacodinâmicos ou de formulação, inaceitáveis, Ho et al., Cancer Res. 37:1640-1643, 1977.

Portanto, necessita-se de uma preparação "depot" de libertação lenta que proporcione uma exposição prolongada e contínua à concentração terapêutica de uma substância activa, sob o ponto de vista biológico. A presente invenção refere-se a tal preparação.

Resumo da Invenção:

A presente invenção prepara um liposoma multivesicular que contém uma substância activa, sob o ponto de vista biológico, encapsulada, na presença de um cloridrato que proporciona uma exposição prolongada e contínua à concentração terapêutica

da substância activa, sob o ponto de vista biológico, com resultados óptimos. A presente invenção fornece, também, métodos de preparação de tais lipossomas multivesiculares.

Os lipossomas multivesiculares possuem alta eficiência de encapsulação, baixa velocidade de libertação da substância encapsulada, bem determinada, distribuição de tamanhos reproduzível, forma esférica, tamanho, médio ajustável que pode aumentar ou diminuir, facilmente, tamanho do compartimento interno ajustável e número.

O processo para a produção de vesículas lipídicas multivesiculares ou lipossomas compreende a dissolução num ou mais solventes orgânicos, de um componente lipídico que contenha, pelo menos, um lípido neutro e pelo menos, um lípido anfipático com uma ou ou mais cargas negativas puras, a adição dentro do componente lipídico, de um primeiro componente aquoso, não-miscível, contendo um cloridrato e uma ou mais substâncias para se encapsularem, a formação de uma emulsão oleosa em água a partir dos dois componentes não-miscíveis, a transferência e imersão da emulsão oleosa e da água dentro de um segundo componente aquoso não-miscível, a dispersão da emulsão oleosa e da água para formar esférulas do solvente contendo, nelas, múltiplas gotas do primeiro componente aquoso e a evaporação dos solventes orgânicos das esférulas de solventes para formar os lipossomas multivesiculares. A utilização dos cloridratos, tal como do ácido clorídrico, é essencial para a alta eficiência da encapsulação e para uma velocidade lenta de libertação de moléculas encapsuladas em fluidos biológicos e in vivo. Quando o cloridrato é ácido, é essencial,

também, utilizar um agente neutralizante de baixo poder iônico para evitar que as esférulas dos solventes adiram, umas às outras.

Portanto, é um objectivo da presente invenção preparar uma preparação "depot" de libertação lenta que proporcione uma exposição prolongada e contínua de uma substância activa, sob o ponto de vista biológico, a uma concentração terapêutica.

É um objectivo adicional da presente invenção, fornecer um método de preparação de tal preparação "depot".

Um objectivo adicional da presente invenção é proporcionar um lipossoma multivesicular que possua uma substância activa, sob o ponto de vista biológico, encapsulada dentro de si, na presença de um cloridrato que proporciona uma exposição prolongada e contínua à concentração terapêutica da substância activa biológica, com resultados óptimos.

Um objectivo adicional da presente invenção é proporcionar um método de preparação de lipossomas multivesiculares.

Outros objectivos adicionais, características e vantagens da presente invenção são inerentes e aparecem durante a memória descritiva e as reivindicações.

Descrição de Aspectos Preferidos:

O termo "lipossomas multivesiculares", utilizado durante a memória descritiva e reivindicações, significa vesículas lipídicas, microscópicas, preparadas pelo homem, que consistem em membranas lipídicas de duas camadas que encerram compartimentos aquosos, não-concêntricos, múltiplos. Em contraste, os liposso-

mas unilamelares possuem um único compartimento aquoso; e os lipossomas multilamelares possuem membranas concêntricas, tipo "casca de cebola", entre as quais estão compartimentos aquosos concêntricos, semelhantes a conchas.

O termo "esférula de solvente", utilizado durante a memória descritiva e reivindicações, significa uma gotícula esferoidal, microscópica, do solvente orgânico, dentro da qual existem gotículas múltiplas, mais pequenas, da solução aquosa. As esférulas de solvente estão em suspensão e, totalmente, imersas numa segunda solução aquosa.

O termo "lípidos neutros" significa óleo ou gorduras que não possuem capacidade de formar, eles próprios, membranas e necessitam de um grupo hidrófilo "cabeça".

O termo "lípidos anfipáticos" significa aquelas moléculas que possuem um grupo hidrofílico "cabeça" e um grupo hidrofóbico "cauda" e possuem a capacidade de formar membranas.

O termo "força iônica" está definido assim: força iônica = $1/2(M_1Z_1^2 + M_2Z_2^2 + M_3Z_3^2 + \dots)$, em que os símbolos $M_1M_2M_3\dots$ representam as concentrações molares dos vários iões na solução e os símbolos $Z_1Z_2Z_3\dots$ representam as suas respectivas cargas.

O termo "força iônica baixa" representa a força iônica menor que, aproximadamente, 0,05 e de preferência, menor que 0,01.

Em resumo, a emulsão "água no lípido" prepara-se, em primeiro lugar, por meio da dissolução dos lípidos anfipáticos em um solvente orgânico volátil para o componente lípidico, adição de um primeiro componente aquoso, não-miscível, ao componente lípidico, assim como da substância a ser encapsulada e de um cloridrato, e depois, emulsão da mistura por meio mecânico. Na emulsão,

as gotículas de água em suspensão no solvente orgânico formarão os compartimentos internos aquosos e a monocamada dos lípidos anfipáticos que reveste os compartimentos aquosos tornar-se-á numa folhinha da bicamada da membrana, no produto final. A emulsão total é imersa, depois, no segundo componente aquoso que contém um ou mais agentes osmóticos, não-iônicos, e um agente neutralizante ácido de baixa força iônica e, depois, agita-se mecanicamente por meio de energia ultrassônica, atomizações de bocal ou suas combinações para formar esférulas de solvente em suspensão no segundo componente aquoso. As esférulas de solvente contêm múltiplas gotículas aquosas com a substância a encapsular, dissolvida nelas. Evapora-se o solvente orgânico volátil das esférulas por meio da passagem de uma corrente gasosa sobre a suspensão. Quando o solvente se evapora completamente, as esférulas convertem-se em lipossomas multivesiculares. Gases representativos satisfatórios para utilização, incluem: azoto, hélio, árgon, oxigênio, hidrogênio e dióxido de carbono.

A utilização de um cloridrato é essencial para uma elevada eficiência de encapsulação e para uma velocidade lenta da libertação de moléculas encapsuladas nos fluídos biológicos e in vivo". Quando o cloridrato é ácido, é essencial, também, utilizar um agente neutralizante de baixa força iônica para evitar que as esférulas de solvente adiram, umas às outras. Prefere-se o ácido clorídrico, mas outros cloridratos que são satisfatórios incluem o cloridrato de lisina, cloridrato de histidina e suas combinações. As quantidades, tanto do cloridrato como do agente neutralizante, utilizadas, podem estar compreendidas entre cerca de

0,1 mM e cerca de 0,5 M de concentração e, de preferência, entre cerca de 10 mM e cerca de 200 mM de concentração.

Podem utilizar-se muitos tipos diferentes de solventes hidrofóbicos voláteis, tais como éteres, hidrocarbonetos e hidrocarbonetos halogenados ou freões, como solventes da fase lipídica. Por exemplo, o éter dietílico, isopropílico e outros éteres, clorofórmio, tetrahidrofurano, éteres halogenados, ésteres e suas combinações são satisfatórios.

Com a finalidade de evitar que as esférulas de solvente adiram, umas às outras, e à parede dos vasos, necessita-se, pelo menos de incluir nas esférulas, uma proporção de 1 por cento molar de um lípido anfipático com uma carga negativa pura, a solução aquosa em suspensão necessita de ter uma força iônica muito baixa e, quando o cloridrato é um ácido, necessita-se de um agente neutralizante de baixa força iônica para absorver o cloridrato; de outro modo, as esférulas de solvente coalescem para formar uma espuma desordenada. São necessários um ou mais agentes osmóticos, não-iônicos, na solução aquosa em suspensão para conservar a pressão osmótica no interior e sem considerar os lipossomas. Podem utilizar-se vários tipos de lípidos para preparar os lipossomas multivesiculares e os dois únicos requisitos são que se inclua um lípido neutro e um lípido anfipático com uma carga negativa pura. Exemplos de lípidos neutros são: trioleína, trioctaniona, óleo vegetal tal como óleo de semente de soja, toucinho, gordura de carne de vaca, tocofero, e suas combinações. Exemplos de lípidos anfipáticos com carga negativa pura são: cardiolipina, as fosfatidilserinas, os fosfatidilgliceróis e os

ácidos fosfatídicos.

O segundo componente aquoso é uma solução aquosa que contém solutos, tais como hidratos de carbono que incluem a glicose, sacarose e lactose, e aminoácidos tais como lisina, histidina de base livre e suas combinações.

Muitas e variadas substâncias biológicas podem incorporar-se por meio de encapsulação dentro dos lipossomas multivesiculares. Estes incluem medicamentos e outras espécies de materiais, tais como ADN, ARN, proteínas de vários tipos, hormonas proteicas produzidas por meio de tecnologia eficaz do ADN recombinante, nos seres humanos, factores de crescimento hematopoiéticos, monokinas, linfoquinas, factor de necrose tumoral, inibina, factores alfa e beta de crescimento tumoral, substância inibidora de Müller, factor de crescimento nervoso, factor de crescimento fibroblástico, factor de crescimento derivado das plaquetas, hormonas da pituitária e da hipófise, incluindo LH e outras hormonas libertadas, calcitonina, proteínas que servem como agentes imunizantes para vacinação e sequências de ADN e de ARN.

O Quadro 1 seguinte inclui uma lista de substâncias activas, representativas sob o ponto de vista biológico, que se podem encapsular nos lipossomas multivesiculares na presença de um cloridrato e que são eficazes nos seres humanos.

Quadro 1

<u>Antiasmático</u>	<u>Antiarrítmico</u>	<u>Tranquilizantes</u>
Metaproterenol	Propanolol	Cloropromazina
aminofilina	atenolol	benzodiazepina
teofilina	verapamil	butirofenonas
terbutalina	captopril	hidroxizinas
Tegretol	isosorbido	meprobamato
efedrina		fenotiazinas
isoproterenol		reserpina
adrenalina		tioxantinas
norepinefrina		
<u>Glicósidos cardiotóxicos</u>	<u>Hormonas</u>	<u>Esteróides</u>
digitalina	antidiurética	prednisona
digitoxina	corticosteroides	triancinolona
lanatosido C	testosterona	hidrocortisona
digoxina	estrogênio	dexametasona
	tiróide do crescimento	betametasona
	ACTH	prednisolona
	progesterona	
	gonadotropina	
	mineralocorticoid	
	LH	
	LHRH	
	FSH	
	calcitonina	

Hipotensores

apresolina

atenolol

Antidiabéticos

Diabenese

insulina

Antihistamínicos

piribenzamina

clorfeniramina

difenhidramina

Antiparasíticos

praziquantel

metronidazol

pentamidina

Anticancerígenos

azatioprina

bleomicina

ciclofosfamida

adriamicina

daunorubicina

vincristina

metotrexato

6-TG

6-MP

vimblastina

VP-16

VM-26

Cisplatina

Fu

Sedativos e analgésicos

morfina

dilaudide

codeína

compostos sintéticos,

similares da codeína

demerol

oximorfona

fenobarbital

barbituratos

Antibióticos

penicilina

tetraciclina

eritromicina

cefalotina

imipenem

cefotaxima

Imunoterápicos

interferon

interleucina-2

anticorpos monoclo-
nais

gamaglobulina

Vacinas

influenza

vírus sincicial respi-
ratóriovacinas contra o Hemo-
filus influenza

	<u>Antifúngicos</u>	<u>Compostos com acção Antiviral</u>
carbenicilina		
vancomicina	anfotericina B	
gentamicina	miconazol	aciclovir e deriva-
tobramicina	muramil-dipeptido	dos
piperacilina	clotrimazol	Wintrop-51711
noxalactam		ribavirina
amoxicilina	<u>Antihipotensores</u>	rimatadina/amantadina
ampicilina		azidotimidina e deri-
cefazolina	dopamina	dos
cefadroxil	dextroanfetamina	adamina arabinosido
cefoxitina		inibidores da protease
outros aminoglicosidos		do tipo da amidina
<u>Proteínas e Glicoproteínas</u>		<u>Outros</u>
linfocinas		bloqueadores dos recep-
interleucinas - 1, 2, 3, 4, 5, e 6		tores de superfície
citocinas		celular
GM-CSF		<u>Ácidos Nucleicos e</u>
M-CSF		<u>Análogos</u>
G-CSF		ADN
factor de necrose tumoral		ARN
inibina		metilfosfonatos e simi-
factor de crescimento tumoral		lares
substância dos inibidores mullerianos.		
factor de crescimento do nervo		
factor do crescimento do fibroblasto		
factor de crescimento derivado das plaquetas		
factores de coagulação (por exemplo VIII, IX, VII)		
insulina		
activador do plasminogénio tecidual		

antigénio da histocompatibilidade

produtos oncogénicos

proteína básica da mielina

colagénio

fibronectina

laminina

outras proteínas preparadas por tecnologia de ADN recombinante.

A dosagem apropriada para os seres humanos está compreendida entre 1 e 6000 mg/m da área da superfície do corpo. A razão de esta gama ser tão grande é que, para algumas aplicações tal como administração subcutânea, a dose requerida deve ser muito pequena, mas para outras aplicações tal como a administração intraperitoneal, a dose desejada a utilizar-se pode ser muito grande. Ainda que se possam administrar doses fora da gama anterior, esta abrange a amplitude de utilização de, praticamente, todas as substâncias activas, sob o ponto de vista biológico.

Os lipossomas multivesiculares podem administrar-se por meio de qualquer via desejada; por exemplo, via intratecal, intraperitoneal, subcutânea, intravenosa, intralinfática, oral e, submucosa, sob muitas espécies diferentes de epitélios, incluindo o epitélio brônquico, o epitélio gastrointestinal, o epitélio urogenital, e várias membranas mucosas do corpo humano, e intramuscular.

Os exemplos seguintes representam, presentemente, métodos preferidos de preparação destes lipossomas multivesiculares

que encapsulam substâncias activas, sob o ponto de vista biológico .

Exemplo 1

Fase 1) Num frasco de vidro de 1 dracma, limpo (1,4 cm de diâmetro x 4,5 cm de altura, nas dimensões exteriores), colocam-se 9,3 umoles de dioleoil lecitina, 2,1 umoles de dipalmitoil fosfatidilglicerol, 15 umoles de colesterol, 1,6 umoles de trioleína e 1 ml de clorofórmio (fase lipídica).

Fase 2) Adicionam-se ao frasco de 1 dracma, anterior, contendo a fase lipídica, 1 ml da fase aquosa, 20 mg/ml de citosina arabinosido, dissolvidos numa solução de ácido clorídrico 0,136N.

Fase 3) Para preparar a emulsão água em óleo, sela-se o frasco e liga-se à cabeça de um agitador em remoínho e agita-se à velocidade máxima, durante 6 minutos.

Fase 4) Para preparar as esférulas de clorofórmio suspensas em água, depois por meio de esguicho, passa-se rapidamente, metade da emulsão através da ponta estreita de uma pipeta de Pasteur, para dentro de frascos de 1 dracma, cada um contendo 4 % de dextrose em água e 40 mM de lisina, base livre, e então, agite-se no agitador em remoínho, durante 3 segundos, a alta velocidade para formar as esférulas de clorofórmio.

Fase 5) Vertem-se as suspensões das esférulas de clorofórmio dos dois frascos no fundo de um frasco de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 5 ml de água, 3,5 g/100 ml de glicose e 40 mM

da base livre, lisina, e derrama-se, um fluxo de azoto gasoso, a 7 l/minuto, através do frasco para evaporar lentamente o clorofórmio, durante 10 a 15 minutos e à temperatura de 37°C. Depois, isolam-se os lipossomas por meio de centrifugação a 600 x g, durante 5 minutos.

A média volume-tamanho ajustado dos lipossomas resultantes ($\pm$ desvio padrão da distribuição) foi de $19,4 \pm 6,5$ μ m. A percentagem de captura foi de 59 ± 7 % e o volume da captura foi de 36 ± 4 μ l/mg dos lípidos totais utilizados. A adição de ácido clorídrico teve marcada influência na velocidade de libertação, da citosina arabinosido dos lipossomas multivesiculares incubados no plasma humano. Metade do medicamento perdeu-se em 12 dias quando se adicionou ácido clorídrico no exemplo anterior, ao passo que metade do medicamento se perdeu, apenas, em 12 horas, quando se omitiu o ácido clorídrico na fase 2 anterior. Quando testada em animais, a adição de ácido clorídrico, novamente, teve marcada influência na taxa de citosina arabinosido libertada; o medicamento manteve-se dentro da cavidade peritoneal dos murganhos muito mais tempo quando se adicionou ácido clorídrico durante a preparação.

O exemplo seguinte ilustra uma escala do processo de preparação de grandes quantidades de lipossomas multivesiculares.

Exemplo 2

Fase 1) Num homogeneizador de aço, limpo (Omni-Mixer 17150 Sorval Co., Newtown, CT), colocaram-se 186 μ moles de dicleoil lecitina, 42 μ moles de dipalmitoil fosfatidilglicerol,

300 umoles de colesterol, 36 umoles de trioleína e 20 ml de clo-
rofórmio (fase lipídica).

Fase 2) Adicionaram-se 20 ml da fase aquosa, 20 mg/ml
de citosina arabinosido, dissolvidos numa solução de ácido clo-
rídrico 0,136N, dentro do misturador de aço, limpo, anterior,
que continha a fase lipídica, enquanto girava.

Fase 3) Para preparar a emulsão água em óleo, selou-se
o homogeneizador e movimentou-se com a marcação de "7", durante
3 minutos.

Fase 4) Para preparar as esférulas de clorofórmio, em
suspensão em água, verteu-se depois, metade da emulsão (enquanto
em remoinho) dentro dos dois outros vasos homogeneizadores de
aço, limpos, cada um contendo 200 ml de 4 % de dextrose em água
e 40 mM de lisina, base livre, e depois, homogeneizou-se no
Omni-Mixer, durante 3 segundos com a marcação "1".

Fase 5) Verteram-se as suspensões de esférulas de clo-
rofórmio de cada vaso homogeneizador dentro de um contentor de
aço rectangular, de 8 x 12 de fundo, e derramou-se uma corrente
de azoto gasoso ou de ar a 14 l/minuto, através do frasco, para
evaporar, lentamente, o clorofórmio, durante 10 a 15 minutos.
Depois, isolaram-se os lipossomas por meio de centrifugação a
600 x g, durante 5 minutos.

O exemplo seguinte ilustra métodos de preparação de li-
pissomas menores ou maiores.

Exemplo 3

Para preparar lipossomas menores do que os dos Exemplos 1 e 2, aumentou-se a força mecânica ou a duração do tempo de agitação ou da homogeneização na Fase 4 dos Exemplos 1 ou 2. Para preparar lipossomas maiores, diminuiu-se a força mecânica ou a duração do tempo de agitação ou da homogeneização na Fase 4 dos Exemplos 1 ou 2.

O exemplo 4 seguinte ilustra métodos representativos de preparação de liposomas de várias composições lipídicas e incorporando vários materiais dentro dos liposomas.

Exemplo 4

Na Fase 1) dos Exemplos 1 ou 2, podem utilizar-se outros lípidos anfipáticos, tais como fosfatidil colinas (FC), cardiolipina (CL), dimiristoíl fosfatidilglicerol (DMFG), fosfatidil etanolaminas (FE), fosfatidil serinas (FS) e ácido dimiristoíl fosfatídico (ADMF), em várias combinações com resultados semelhantes. Por exemplo, FC/C/CL/TO na proporção molar 4,5/4,5/1/1; DOPC/C/FS/TO na proporção molar 4,5/4,5/1/1; FC/C/DPPG/TC na proporção molar: 5/4/1/1; FC/C/PG/TC na proporção molar 5/4/1/1; FE/C/CL/TO na proporção molar: 4,5/4,5/1/1; FC/C/DMPA/TO na proporção molar: 4,5/4,5/1/1 são combinações que se podem utilizar. Para incorporar outros materiais activos biogénéticos, simplesmente substituiu-se a citosina arabinosido por um material desejado ou uma combinação de materiais do Quadro 1, na Fase 2 do Exemplo 1 ou 2. Todas estas

fornece lipossomas multivesiculares que são eficazes nos seres humanos e proporcionam exposição prolongada à substância activa, sob o ponto de vista biológico, em concentrações terapêuticas

Assim, a presente proporciona preparações "depot" de vastas aplicações e utilizações, nas quais as substâncias activas, sob o ponto de vista biológico, estão encapsuladas em quantidades relativamente grandes e proporciona exposição prolongada, em concentrações terapêuticas a estas substâncias com óptimos resultados o que evita "picos" altos de dosagem que podiam ser tóxicos.

A presente invenção, por conseguinte, está bem ajustada e adaptada para atingir as finalidades e objectivos e possui as vantagens e características mencionadas, assim como outras inerentes.

Ainda que tenham sido dados aspectos preferidos, presentemente, de esta invenção para o objectivo da descoberta, podem efectuar-se alterações que estejam dentro do espírito da presente invenção, definidas pelo propósito das reivindicações anexas.

R e i v i n d i c a ç õ e s

1.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas de acção prolongada, para administração sob a forma de depósito utilizando diversas vias de administração como, por exemplo, intraperitoneal, endovenosa, subcutânea, oral, intralinfática, etc., contendo substâncias activas sob o ponto de vista biológico encapsuladas na presença de um cloridrato e eventualmente de um agente neutralizante em liposomas ou vesículas microscópicas de um lípido que incluem múltiplos compartimentos aquosos não concêntricas, caracterizado pelo facto:

a) de se dissolver em um ou mais dissolvente(s) orgânicos) um composto lipídico que contém, relativamente a esses dissolventes, pelo menos um "lípido neutro" isto é um óleo ou gordura que não é

capaz de formar membrana e pelo menos um "lípidio anfipático" isto é um lípidio cujas moléculas comportam um grupo hidrofílico ("cabeça") e um grupo hidrófobo ("cauda") com pelo menos uma carga eléctrica negativa;

- b) de se adicionar ao composto lipídico citado antes uma solução aquosa de um primeiro princípio activo não miscível contendo um cloridrato e uma ou mais substâncias que se pretendam encapsular;
- c) de se formar uma emulsão água em óleo a partir dos dois compostos não miscíveis citados antes;
- d) de se transferir a emulsão água em óleo citada antes para o seio de uma solução aquosa de um segundo composto não miscível;
- e) de se dispersar a emulsão água em óleo citada antes para se obter esférulas de dissolvente contendo no seu interior múltiplas gotículas da solução aquosa de um primeiro composto adicionado na fase (b) e
- f) de se separar os dissolventes orgânicos das esférulas por evaporação para se obter os liposomas multivesiculares.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar como composto lipídico um fosfolípido ou uma mistura de fosfolípidos.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de se utilizar como composto lipídico um fosfolípido escolhido entre fosfatidilcolina, cardiolipina, fosfatidiletanol

amina, esfingomielina, lisofosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol ou ácido fosfatídico.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de se utilizar pelo menos um fosfolípido com pelo menos uma carga eléctrica negativa.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de se utilizar um fosfolípido misturado com colesterol.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de se utilizar um fosfolípido misturado com estearilamina.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar uma substância lipofílica activa sob o ponto de vista biológico misturada com um composto lipídico.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar como "lípidio neutro" um lípidio escolhido entre trioleína, trioctanoína, azeite, banha, gordura de carne, tocoferol ou misturas destes produtos.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracte-

4.

rizado pelo facto de se utilizar um dissolvente orgânico escolhido entre o éter etílico, o éter isopropílico, o clorofórmio, o tetra-hidrofurano, éteres, hidrocarbonetos, hidrocarbonetos halogenados, éteres halogenados, ésteres ou misturas destes compostos.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar um cloridrato escolhido entre o ácido clorídrico, o cloridrato de lisina, o cloridrato de histidina ou misturas destes produtos.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se preparar a emulsão dos dois compostos citados antes mediante a utilização de métodos escolhidos entre agitação mecânica, agitação ultrasónica ou atomização.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de se prepararem liposomas cujo diâmetro médio e número de compartimentos aquosos no seu interior depende do tipo, intensidade e duração do método de preparação escolhido.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar um cloridrato ácido e uma solução aquosa de um segundo composto que contém pelo menos um agente neutralizante.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de se utilizar como agente neutralizante a lisina ou a histidina sob a forma de bases livres ou as suas misturas.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar um segundo composto que em solução aquosa apresenta diminuta concentração iónica.

17.- Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de se utilizar como segundo composto solutos de hidratos de carbono e aminoácidos em solução aquosa.

18.- Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de se utilizar como segundo composto solutos de glucose, sacarose, lactose, lisina sob a forma de base livre, histidina sob a forma de base livre ou as suas misturas em solução aquosa.

19.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se preparar esférulas de dissolvente mediante a utilização de métodos escolhidos entre agitação mecânica, agitação ultrasónica, atomização ou as suas associações.

20.- Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de se prepararem liposomas cujo diâmetro médio

4.

depende do tipo, intensidade e duração da energia utilizada.

21.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se eliminar o dissolvente por evaporação mediante passagem de uma corrente gasosa através da solução aquosa do segundo composto.

22.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se encapsular substâncias activas sob o ponto de vista biológico escolhidas entre as substâncias apresentadas no seguinte Quadro:

QUADRO 1

Antiasmáticos	Antiarrítmicos	Tranquilizantes
metaproterenol	propanolol	clorpromazina
aminofilina	atenolol	benzodiazepina
teofilina	verapamil	butirofenonas
terbutalina	captopril	hidroxizinas
tegretol	isosorbide	meprobamato
efedrina		fenotiazinas
isoproterenol		reserpina
adrenalina		tioxantinas
norepinefrina		

...

<u>Glicosidos cardiotônicos</u>	<u>Hormonas</u>	<u>Esteróides</u>
digitalina	antidiurética	prednisona
digitoxina	corticosteróides	triancinolona
lanatosido C	testosterona	hidrocortisona
digoxina	estrogênio	dexametazona
	tiróide	betametosona
	do crescimento	prednisolona
	ACTH	
	progesterona	
	gonadotropina	
	mineralocorticoide	
	LH	
	LHRH	
	FSH	
	calcitonina	
<u>Hipotensores</u>	<u>Antidiabéticos</u>	<u>Antiistamínicos</u>
apresolina	diabinese	piribenzamina
atenolol	insulina	clorfeniramina
		difenidramina
<u>Antiparasíticos</u>	<u>Anticancerígenos</u>	<u>Sedativos e analgésicos</u>
praziquantel	azatioprina	morfina
metronidazol	bleomicina	dilaudide
pentamidina	ciclofosfamida	codeína
	adriamicina	outros compostos

daunorubicina	químicos similares à
vincristina	codeína
metotrexato	demerol
6-TG	oximorfona
6-MP	fenobarbital
vinblastina	barbituratos
VP-16	
VM-26	
cisplatina	
FU	

Antibióticos

penicilina
tetraciclina
eritromicina
cefalotina
imipenem
cefotaxime
carbenicilina
vancomicina
gentamicina
tobramicina
piperacilina
moxalactam
amoxicilina
ampicilina

Imunoterápicos

interferon
interleucina-2
antibodies monoclonais
gamaglobulina

Antifúngicos

anfotericina B
miconazol
muramil-dipeptide

clotrimazol

Antiipotensores

dopamine
dextroanfetamina

Vacinas

influenza
vírus sincicial respira-
tório
vacina contra o hemofilus
influenza

Compostos com acção

antiviral

aciclovir e derivados
Winthrop-51711
ribavirina
rimantadina/amantadina
azidotimidina e derivados
adenina-arabinosido
inibidores da protease

cefazolina

cefadroxil

cefoxitine

outros aminoglicosidos

Proteínas e glicoproteínas

linfocinas

interleucinas - 1,2,3,4,5 e 6

citocinas

GM-CSF

M -CSF

G -CSF

factor de necrosetumoral

inibina

factor de crescimento tumoral

substância dos inibidores mullerianos

factor de crescimento do nervo

factor de crescimento do fibroblasto

factor de crescimento derivado das plaquetas

factores de coagulação (e.g. VIII, IX, VII)

activador do plasminogénio tecidular

antigénio da histocompatibilidade

oncogénicos

proteína básica da mielina

selagénio

do tipo da amidina

Outros bloqueadores dos
receptores da superfície
celular

Ácidos nucleicos e análogos

DNA

RNA

metilfosfonatos e similares

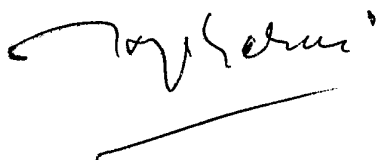
fibronectina

laminina

outras proteínas preparadas por engenharia genética,

Lisboa, 23 de Fevereiro de 1988

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



4.

R E S U M O

"Processo para a preparação de composições farmacêuticas contendo princípios activos encapsulados na presença de um cloridrato em liposomas multivesiculares"

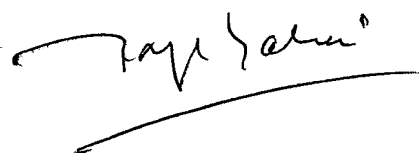
Descreve-se um processo para a preparação de composições farmacêuticas para administração através de diversas vias, que consiste em dissolver um composto lipídico em dissolventes orgânicos voláteis, em adicionar à solução resultante uma outra solução aquosa de um composto não miscível contendo um cloridrato e uma ou mais substâncias activas sob o ponto de vista biológico que se pretende(m) encapsular mediante a preparação de uma emulsão de água em óleo utilizando os dois compostos citados antes, em introduzir a emulsão resultante no seio de uma solução aquosa de um segundo composto, em dispersar a emulsão citada antes em pequenas esférulas de dissolvente que contêm pequenos compartimentos aquosos ainda mais pequenos e em evaporar depois os dissolventes para se obter uma suspensão aquosa de liposomas multivesiculares contendo substâncias activas sob o ponto de vista biológico.

Os liposomas multivesiculares preparados de acordo com a presente invenção, que contêm substâncias activas sob o ponto de vista biológico, exibem diâmetros uniformes, dimensão média ajustável, número e dimensão de compartimentos internos também ajustável, elevada capacidade de encapsulação e velocidade de

cedência das substâncias activas citadas antes mais lenta do que
a das composições preparadas por técnicas convencionais.

Lisboa, 23 de Fevereiro de 1988

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Rui Sá", with a long horizontal line underneath it.