



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

(11) PI 0703747-3 B1



(22) Data do Depósito: 31/08/2007

(45) Data de Concessão: 04/05/2021

(54) Título: FORMA FARMACÊUTICA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMA FARMACÊUTICA E USO

(51) Int.Cl.: A61K 9/56; A61K 31/557; A61K 31/5575; A61P 29/00; A61P 31/00; (...).

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) Inventor(es): LÚCIA HELENA FACCIOLI; ROBERTO NICOLETE.

(57) Resumo: FORMA FARMACÊUTICA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMA FARMACÊUTICA E USO. A presente invenção trata de formas farmacêuticas contendo microesferas biodegradáveis que contém mediadores lipídicos, utilizadas em processos inflamatórios, infecciosos e doenças ósseas degenerativas.

“FORMA FARMACÊUTICA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMA FARMACÊUTICA E USO.”

[001] A presente invenção trata de formas farmacêuticas contendo microesferas biodegradáveis que contêm prostaglandina E₂ e outros mediadores lipídicos na imunomodulação da liberação ou indução de citocinas e quimiocinas em processos inflamatórios, infecciosos e doenças ósseas degenerativas.

Estado da Técnica

[002] Prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas, entre outros, são metabólitos do ácido araquidônico e produzidos por vários tipos celulares que, além de mediadores de processos inflamatórios são importantes imunomoduladores da liberação de citocinas e quimiocinas, nas respostas imune inata e adquirida. Embora estes mediadores apresentem potencial para serem utilizados como adjuvantes e/ou imunomoduladores das respostas imunes, eles são altamente instáveis em solução, o que dificulta seu uso *in vivo*.

[003] O invento trata-se de uma técnica para micro-encapsulamento de mediadores lipídicos, em especial o eicosanóide Prostaglandina E₂ (PGE₂). Dados da literatura revelam tanto efeitos pró-inflamatórios quanto anti-inflamatórios exercidos pelas prostaglandinas, dependendo do padrão da resposta imune montada pelo hospedeiro contra o agente da infecção ou inflamação. Além disto, as microesferas preservam a integridade biológica da molécula encapsulada e permitem uma liberação lenta e gradual da mesma, minimizando os efeitos da sua metabolização no ambiente externo e possibilitando menor número de administrações de reposição.

[004] Inúmeras terapias existentes no mercado utilizam inibidores da síntese de precursores intracelulares da produção da PGE₂ ou antagonistas de seus receptores celulares. O emprego destes compostos tem como objetivo inibir a atividade biológica da molécula de PGE₂ nos diferentes tipos celulares envolvidos nos processos inflamatórios e/ou infecciosos. Pouco se conhece sobre terapias que abordem a administração direta desta molécula e de outros mediadores lipídicos nestes processos com a finalidade de modular a liberação de citocinas e quimiocinas, ou ainda, diminuir a produção daquelas com ação deletéria para o organismo.

[005] Vários métodos de obtenção de micropartículas são descritos, dependendo das características moleculares dos compostos alvos do processo de encapsulamento. Alguns inventores, por exemplo, já desenvolveram métodos e equipamentos para a obtenção de micropartículas de tamanhos uniformes, como no documento US 2001008874, US 2005129946, US 2005158547, US 2005196457, US 2007172426.

[006] Uma liberação gradual e sustentada do mediador é de grande importância, uma vez que dados da literatura demonstram que a administração sistêmica de PGE₂ em solução pode provocar perda de função renal (STUART I. MYERS, MD, LI WANG, BS, DANIEL J. MYERS, RICHMOND, VA, CHATTANOOGA, TENN. Loss of renal function and microvascular blood flow after suprarenal aortic clamping and reperfusion (SPACR) above the superior mesenteric artery is greatly augmented compared with SPACR above the renal arteries. *Journal of Vascular Surgery*, 45(2): 357-366, 2007), formação de trombos (GROSS, S., TILLY, P., HENTSCH, D., VONESCH, J.L., FABRE, J.E. Vascular wall-produced prostaglandin E₂ exacerbates arterial thrombosis and atherothrombosis through platelet EP₃ receptors. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(2): 311-320, 2007), hipotensão severa, dentre outros efeitos colaterais.

[007] As microesferas podem ser utilizadas como tratamento de processos inflamatórios ou infecciosos, localizados ou sistêmicos, como por exemplo: artrite reumatóide, peritonite, choques endotoxêmicos, doenças autoimunes, vasoconstrição periférica, dependendo da progressão da resposta imune, avaliada através de parâmetros fisiológicos e níveis de citocinas e quimiocinas produzidas pelas células envolvidas.

[008] Após a administração, as microesferas são lentamente degradadas, através dos fenômenos de erosão e difusão pelos poros do polímero. Tais fenômenos fazem com que o princípio ativo seja liberado no ambiente externo e possa gradualmente, conforme a quantidade liberada, exercer suas ações biológicas.

[009] O invento traz como vantagens um sistema micro-particulado que permite a preservação do ativo encapsulado, bem como sua gradual liberação para o meio externo. A formulação proposta poderá modular a resposta inflamatória, infecciosa ou processos degenerativos no organismo alvo da terapia, diminuindo os efeitos deletérios iniciais da resposta imune ou da inflamação nos tecidos ou órgãos afetados. Além disto, em quadros de doenças ósseas degenerativas, a PGE₂ liberada do interior das microesferas poderá favorecer o aumento da massa óssea e atuar como uma terapia associada com outros fármacos, possibilitando a resolução da doença.

[010] As microesferas poderão ser administradas por diferentes vias (intranasal, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa, etc.), após reconstituição em um veículo aquoso apropriado, como água para injetáveis ou solução fisiológica estéril.

Descrição Resumida da Invenção

[011] A presente invenção trata de formas farmacêuticas contendo microesferas biodegradáveis que contêm mediadores lipídicos, seu processo de obtenção e seu uso.

Descrição Detalhada da Invenção

[012] A presente invenção trata de formas farmacêuticas contendo microesferas biodegradáveis que contêm mediadores lipídicos. As microesferas são constituídas de ácidos láctico, glicólico, hialurônico, poliacrilatos, poliamidas, poliésteres, poliuretanos, poliacrilamidas, polietileno, trietanolamina, extratos glicólicos de plantas, resinas, fibras naturais, quitosana; preferencialmente, emprega-se os ácidos láctico e glicólico. A proporção entre os ácidos pode variar entre 20 e 80% de cada ácido e a quantidade dos ácidos pode variar entre 10 e 500 mg.

[013] As microesferas compreendem mediadores lipídicos que podem ser leucotrienos, prostaglandinas, lipoxinas e outros derivados do ácido araquidônico; preferencialmente, a prostaglandina E₂. A quantidade do mediador lipídico pode estar entre 0,1 a 1 mL.

[014] As microesferas possuem diâmetro variando em função de sua via de administração e/ou da possibilidade de interação com as células do sistema imune. Quando administradas pelas vias endovenosa, intratraqueal ou intranasal, podem apresentar diâmetro entre 5 e 6 µm.

[015] A invenção trata ainda do processo de obtenção das microesferas que possui as etapas:

- (a) dissolução dos ácidos orgânicos e do mediador lipídico em um solvente orgânico;
- (b) adição da fase (a) em uma fase aquosa externa, contendo um tensoativo;
- (c) eliminação do solvente e do tensoativo
- (d) lavagem e liofilização

[016] O solvente orgânico citado pode ser diclorometano, clorofórmio, hexano e qualquer outro solvente conhecido do homem da técnica e sua quantidade pode variar de 5 mL a 20 mL.

[017] O processo também utiliza um tensoativo que pode ser preferencialmente o PVA (álcool polivinílico). Podem ser utilizados também outros compostos como o poloxamer ou outros surfactantes específicos. A concentração do tensoativo pode variar de 0,1% a 5% (m/v). O processo é realizado a uma temperatura que pode variar de 20 a 25°C.

[018] A eliminação do solvente descrito na etapa (c) ocorre por meio de extração-evaporação, inativação do gás solvente por outros produtos químicos ou sistemas a vácuo; preferencialmente, emprega-se extração-evaporação.

[019] A invenção contempla, ainda, microesferas obtidas no processo descrito acima.

[020] As microesferas, segundo a invenção, podem ser empregadas em processos inflamatórios ou infecciosos, localizados ou sistêmicos e contra artrite reumatóide, peritonite, choques endotoxêmicos, vasoconstrição periférica e doenças autoimunes e degenerativas.

[021] A seguir, exemplos para melhor ilustrar a invenção, contudo, este não possui o intuito de restringir a invenção aqui descrita.

Exemplo 1: Obtenção das microesferas

[022] Nos ensaios foram obtidas microesferas pelo método da emulsão e evaporação do solvente: fase orgânica contendo os mediadores e o polímero PLGA 50:50 (50 mg PLGA + 10 mL de diclorometano + 0,3 mL de PGE₂ 1mg/mL) e fase aquosa contendo tensoativo (40 mL de PVA 3g/100 mL de água). Como controle foram utilizadas microesferas sem a incorporação dos mediadores.

[023] A **Figura 1** apresenta um esquema da obtenção de microesferas pelo método de evaporação do solvente, sendo que A: emulsificação do solvente + polímero (fase interna) e água + tensoativo (fase externa); B: eliminação do solvente por agitação; C: solvente e tensoativo são totalmente eliminados, formando a microesfera.

[024] As microesferas obtidas apresentam diâmetro entre 5 e 6 µm. A **Figura 2** mostra a microfotografia eletrônica de varredura das microesferas de PGE₂; 2,00 K; EHT 10,00 kV.

Exemplo 2: Efeito antiinflamatório exercido pelas microesferas de PGE₂.

[025] Os resultados revelaram que as mesmas foram capazes de diminuir os níveis da citocina TNF- α produzida por macrófagos peritoneais murinos em cultura estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (**Figura 3**). A figura 3 mostra o efeito das microesferas de PLGA contendo PGE₂ na inibição da liberação de TNF- α por macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS (0,5 µg/mL). Macrófagos foram incubados com 2 mg de microesferas vazias ou contendo PGE₂ e PGE₂ em solução, em meio RPMI completo durante 1 h. Após estímulo com LPS por 2 h em temperatura humidificada (37°C, 5% CO₂), foram coletados os sobrenadantes celulares. Os níveis de TNF- α (pg/mL) foram determinados por ELISA. Resultados expressos como Média \pm EPM de 3 experimentos diferentes ($n = 3$); ** $P < 0,01$, valores relativos ao grupo controle (meio). # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$, relativos às células estimuladas com LPS. Além disto, demonstramos também que as microesferas de PGE₂ foram capazes de diminuir a fagocitose delas próprias por macrófagos peritoneais murinos em cultura (**Figura 4**). Os resultados revelaram que o mediador encapsulado e liberado para o meio externo foi capaz de exercer sua atividade biológica durante o ensaio. A Figura 4 apresenta macrófagos peritoneais murinos que fagocitaram (A) microesferas controle de PLGA ou

(B) microesferas de PGE₂. Células identificadas por coloração panóptica e visualizadas por microscopia óptica, aumento de 1000x. As setas negras mostram as partículas que foram fagocitadas.

[026] Outro resultado importante proveniente dos estudos envolvendo a administração das microesferas em modelos de inflamação e infecção *in vivo* foi o aumento da sobrevivência dos animais submetidos ao quadro de sepse aguda (**Figura 5**). A figura 5 mostra que as microesferas de PGE₂ aumentam a sobrevivência de camundongos submetidos à CLP. *A*, animal CLP (controle), CLP injetado com microesferas vazias, CLP injetado com microesferas de PGE₂ 1 h antes do procedimento e CLP + PGE₂ em solução. *B*, animal CLP (controle), CLP injetado com microesferas vazias, CLP injetado com microesferas de PGE₂ 48 h após o procedimento e CLP + PGE₂ em solução. Animais ($n = 7$, por grupo) submetidos à cirurgia foram acompanhados durante 7 dias e os resultados foram expressos como % de sobrevivência.

[027] Neste ensaio, foi realizada a cirurgia de ligação e ruptura do ceco (CLP), o que provocou um quadro de sepse aguda nos animais avaliados. Nestes casos de choque endotoxêmico induzido pela CLP há uma grande liberação de mediadores inflamatórios, dentre estes a citocina TNF- α , responsável pelo agravamento do quadro inflamatório e infeccioso. A formulação foi capaz de controlar a evolução da sepse nos estágios iniciais e aumentar a sobrevivência dos animais avaliados, principalmente quando as microesferas foram administradas nas primeiras horas após a indução da sepse (1h), conforme demonstrado pelos dados de sobrevivência (%) dos animais (**Figura 5A**).

REIVINDICAÇÕES

- 1. Forma farmacêutica para tratar processos inflamatórios ou infecciosos, localizados ou sistêmicos**, caracterizada pelo fato de consistir de ácidos láctico e glicólico em proporção entre 20 e 80% de cada ácido, em quantidades de 10 mg a 500 mg em microesferas biodegradáveis contendo o mediador lipídico prostaglandina E₂ em quantidade entre 0,1 mL e 1 mL
- 2. Forma farmacêutica** de acordo com reivindicação 1, caracterizada pelo fato de o diâmetro das microesferas variar entre 5 e 6 µm, em função de sua via de administração e/ou da possibilidade de interação com as células do sistema imune.
- 3. Processo de obtenção de forma farmacêutica, definida nas reivindicações 1 a 2**, caracterizado por consistir nas etapas:
 - (a) dissolução dos ácidos orgânicos e do mediador lipídico em o solvente orgânico diclorometano na proporção 50:50;
 - (b) adição da fase obtida na etapa (a) em uma fase aquosa externa contendo o tensoativo álcool polivinílico (PVA) sendo diluído em 40 mL de PVA 3g/100 mL de água;
 - (c) eliminação do solvente e do tensoativo por meio de extração-evaporação, inativação do gás solvente por outros produtos químicos ou sistemas a vácuo;
 - (d) lavagem e liofilização.
- 4. Processo de obtenção de forma farmacêutica** de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de o solvente orgânico poder ser escolhido entre diclorometano, clorofórmio, hexano e qualquer outro solvente conhecido do homem da técnica.
- 5. Processo de obtenção de forma farmacêutica** de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de a quantidade do solvente orgânico estar entre 5 mL a 20 mL.
- 6. Processo de obtenção de forma farmacêutica** de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de a concentração do tensoativo estar entre 1% a 5% (m/v).
- 7. Processo de obtenção de forma farmacêutica** de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de ser desenvolvido em temperatura entre 20 e 25°C.
- 8. Processo de obtenção de forma farmacêutica** de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de a eliminação do solvente descrito na etapa (c) ocorrer por extração-evaporação.

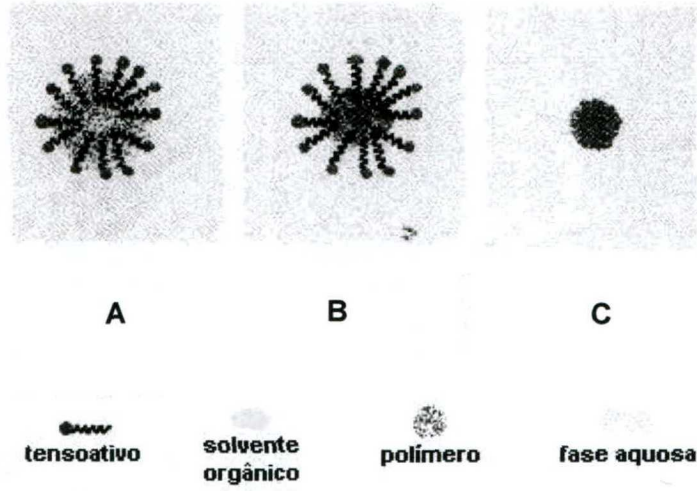


FIGURA 1

18

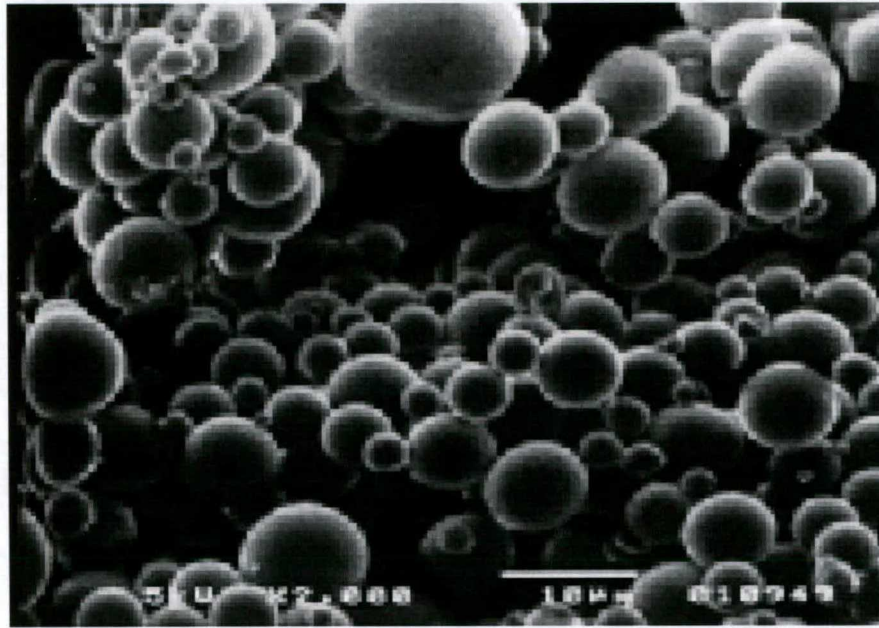


FIGURA 2

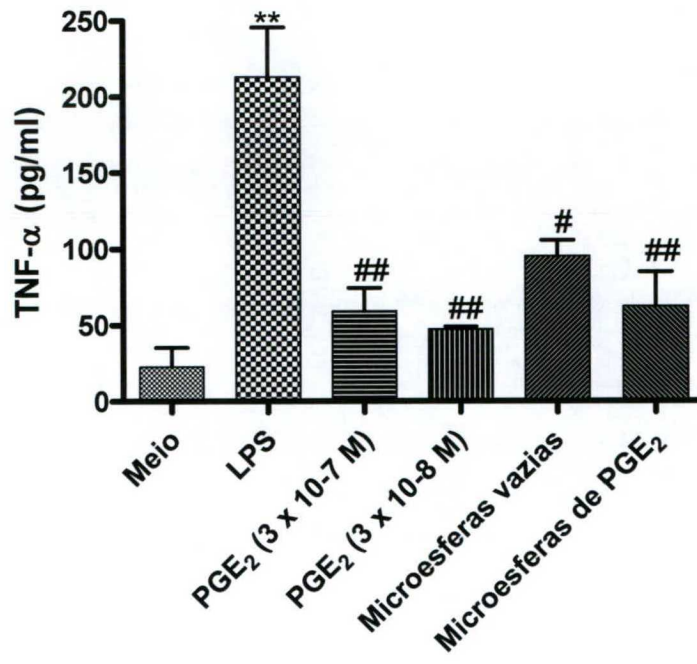
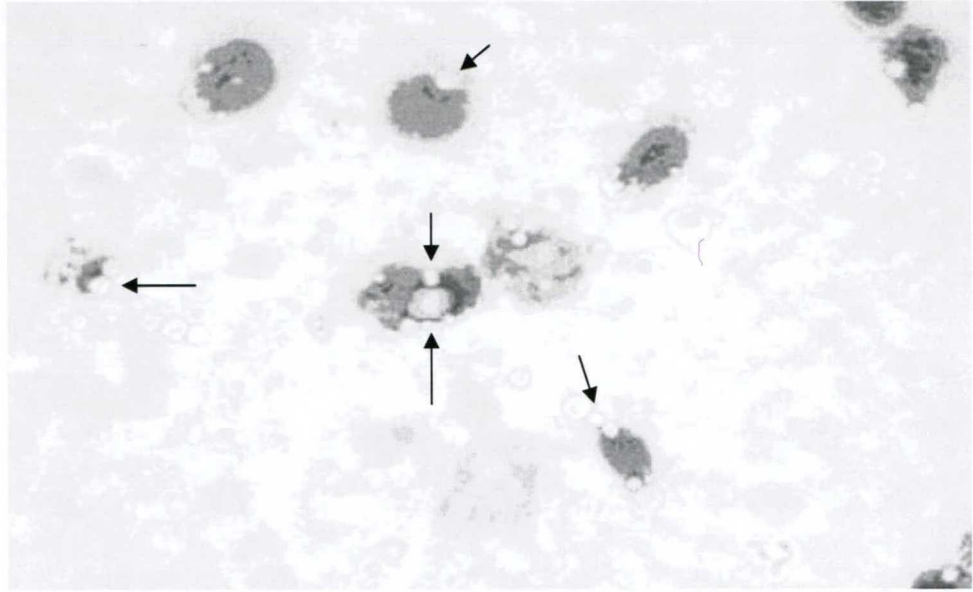


FIGURA 3

A



B

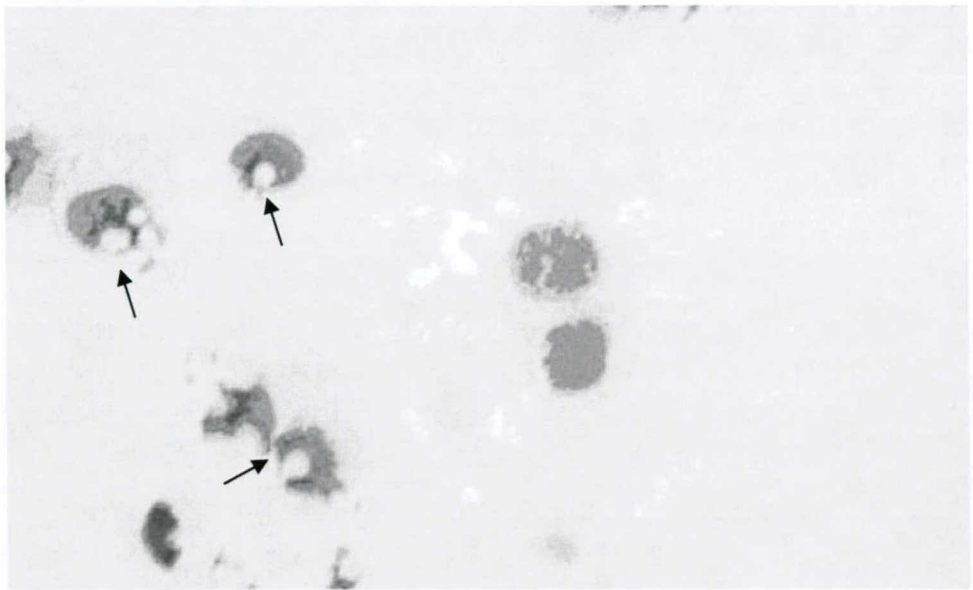
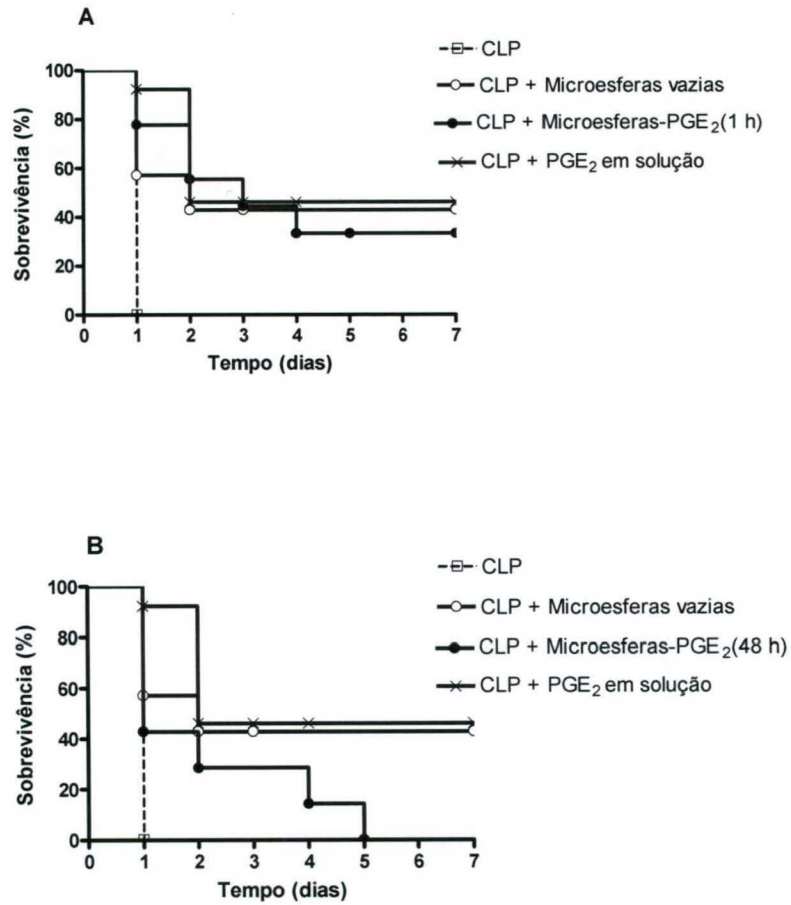


FIGURA 4

21

**FIGURA 5**