

(11) Número de Publicação: **PT 1313453 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 9/16 (2007.10) **A61K 47/30** (2007.10)
A61K 47/38 (2007.10) **A61K 31/727** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2001.07.05**

(30) Prioridade(s): **2000.07.07 FR 0008902**

(43) Data de publicação do pedido: **2003.05.28**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.05.21**
138/2008

(73) Titular(es):

LABORATORIOS FARMACEUTICOS ROVI, S.A.
35, CALLE JULIAN CAMARILLO 28037 MADRID
ES

(72) Inventor(es):

NATHALIE UBRICH FR
CLAUDE VIGNERON FR
PHILIPPE MAINCENT FR

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VECTORES PARTICULADOS DESTINADOS A MELHORAR A ABSORÇÃO ORAL DE PRINCÍPIOS ACTIVOS**

(57) Resumo:

RESUMO

**"VECTORES PARTICULADOS DESTINADOS A MELHORAR A ABSORÇÃO
ORAL DE PRINCÍPIOS ACTIVOS"**

Vectores particulados destinados a melhorarem a absorção oral de princípios activos, em que os mesmos são formados por uma matriz polimérica que compreende pelo menos um polímero biodegradável associado a pelo menos um polímero policatiónico.

DESCRIÇÃO**"VECTORES PARTICULADOS DESTINADOS A MELHORAR A ABSORÇÃO
ORAL DE PRINCÍPIOS ACTIVOS"**

A presente invenção relaciona-se com vectores particulados destinados a aumentarem a absorção dos princípios activos após administração oral quer no homem quer no animal.

É actualmente admitido que a maioria dos princípios activos que serão utilizados nos próximos 30 anos ainda não foram descobertos. Além dos estudos previdentes concorda-se em pensar que a maioria destes princípios activos futuros, devido a técnicas de génio biológico, serão os péptidos e/ou as proteínas. Estes novos fármacos serão extremamente activos com doses eficientes que serão da ordem do micrograma ou menos. Alguns fármacos, principalmente dos péptidos, já estão no mercado norte-americano ou europeu (análogos da LH/RH, hormona de crescimento, estreptoquinase, anticorpos...). Mais de uma centena de péptidos e proteínas estão actualmente sob testes clínicos no homem.

Os péptidos e as proteínas, actualmente no mercado, apresentam um certo número de inconveniências que limitam a sua utilização no homem:

- a única via de administração é a via parentérica (intravenosa, subcutânea, intramuscular) e
- a sua meia-vida de eliminação no organismo é rápida, o que requer administrações múltiplas.

Actualmente não existem formas farmacêuticas que permitam a administração oral das proteínas e péptidos considerando que as formas multiparticuladas, destinadas ao modo parentérico, estão presentes no mercado desde há vários anos (Enantone® do laboratório Takeda, Sandostatine® dos laboratórios Novartis).

A ausência de formas destinadas à via oral explica-se pela sensibilidade dos péptidos e das proteínas aos sucos digestivos que danificam os medicamentos proteicos do mesmo modo que as proteínas alimentares; o que resulta numa ausência praticamente total de resultados de absorção devido à destruição inicial. A via oral é facilmente a via mais comum e a mais facilmente aceitável no homem, a colocação de uma forma que permita proteger os péptidos e as proteínas da inactivação pelos sucos digestivos bem como que permita a absorção gastrointestinal representaria um progresso terapêutico enorme neste começo de século.

É devido a esta inactivação pelas enzimas proteolíticas do tracto gastrointestinal que é administrada a insulina, um péptido de 51 aminoácidos, desde então quase 80 anos através de modo parentérico. Alguns testes de

melhoria da absorção de péptidos e de proteínas através de via oral foram efectuados. Vários trabalhos da literatura mencionam um aumento da absorção da insulina por exemplo através da via oral quando esta última está incorporado em nanocápsulas de poli(isobutilcianoacrilato) (MICHEL C., *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., **43**, 1-5 (1991); DAMGE C., *et al.* Diabetes, **37**, (1988), 246-251). Estas nanocápsulas apresentam uma estrutura vesicular correspondente às das nanogotículas de óleo rodeado por uma membrana muito fina do polímero. Porém o polímero escolhido é conhecido pelo seu carácter tóxico ao nível celular o que não pode permitir a consideração de uma administração repetida durante vários anos. Do mesmo modo, a presença de óleo no coração das nanocápsulas poria, a longo termo, problemas de toxicidade ao nível dos locais de administração o que não permite considerar o comércio de nanocápsulas de insulina.

Por outro lado, o efeito hipoglicémico não foi observado ao cabo de 2 dias provavelmente devido a um fraccionamento muito limitado das partículas pela membrana mucosa intestinal e uma libertação lenta da insulina. As nanopartículas de insulina preparadas com o mesmo polímero (polialquilcianoacrilato) e administradas através de via oral não apresentaram nenhuma actividade hipoglicémica (COUVREUR P. *et al.*, Acta Pharm. Technol., **26**, (1980), 220-222).

Do mesmo modo, a administração por via oral da ciclosporina é irregular e eminentemente variável apesar da

da colocação de uma microemulsão como forma farmacêutica (Neoral®, dos laboratórios de Novartis). A clarificação de nanopartículas de ciclosporina permitiu aumentar a biodisponibilidade oral deste princípio activo que permanece actualmente limitado a menos de 5% (FORD J., *et al.* Int.J. Pharm., **183**, (1999), 3-6).

A heparina é utilizada desde aproximadamente cinquenta anos na prevenção e no tratamento da doença tromboembólica, mas apresenta a inconveniência de ser particularmente hemorrágica e requerer uma vigilância biológica e clínica rígida. Fora das anomalias funcionais da hemostase que requerem um estado de hipercoagulabilidade (défice congénito ou aquisição em anti-trombina III, co-factor II, proteínas C e S), verificam-se diferentes factores de risco da doença tromboembólica definida como um conjunto de problemas da hemostase que conduz à formação de coágulos de fibrina ou sementes plaquetárias à luz de um vaso sanguíneo.

Estes factores de risco relacionados com o paciente são:

- a idade: a doença alcança mais de 50% dos sujeitos com idade superior a 40 anos
- o sexo: frequência da doença mais elevada na mulher com menos de 40 anos, e especialmente durante gravidez
- a obesidade
- a tomada de oestrogenos

- o tabagismo
- a hipertensão arterial
- a diabetes
- a hipercolesterolemia
- o aleitamento que favorece a estase
- as veias varicosas
- a insuficiência cardíaca
- a intervenção cirúrgica: a frequência da doença aumenta em situação pós-cirúrgica.

A heparina é um muco-polissacarídeo aniónico com sulfato natural constituído de unidades osídicas de glucosaminas D e de ácidos glucurónicos ou idurónicos, sintetizados pelos mastocitos e extraídos industrialmente do pulmão de boi ou do intestino de porco. As glucosaminas e os ácidos e urónicos podem ser substituídos por unidades de sulfatos ou acetilos determinando assim uma dezena de unidades osídicas diferentes. Estes unidades diferentes distribuem-se de modo muito coerente, definindo três regiões intramoleculares em que uma entre elas apresenta uma estrutura de pentassacarídeo, local de acção entre a heparina e a antitrombina III. Ligando-se à antitrombina III, a heparina catalisa a inactivação de vários factores de coagulação a trombina e o factor Xa em particular. Isto resulta num alargamento do tempo de coagulação medido pelo tempo de cefalina activada. A heparina é na realidade uma substância muito heterogénea uma vez que compreende um mosaico de moléculas de cadeia sacarídica de peso molecular compreendido entre 2500 e 40000 daltons. As cadeias

polissacarídicas da heparina natural podem ser fraccionadas através de diversos processos (cromatográfico, hidrólise química e enzimático), permitindo a obtenção de heparina de baixo peso molecular (HBPM) dotada de propriedades originais que as distinguem da heparina não fraccionada. Para o médico, as propriedades mais importantes são o tempo de meia-vida cerca de duas vezes mais longo, um efeito anticoagulante fraco ou ausente, uma facilidade maior de administração através de via subcutânea, uma tolerância local melhor, um fraco poder hemorrágico e uma farmacocinética mais longa.

A administração de heparina faz-se actualmente através de modo parentérico, ou através de modo intravenoso ou subcutâneo. Este tipo de administração é porém coercivo e pode colocar problemas de observância para os pacientes. Além disso, uma vez injectada através da via intravenosa, a heparina é eliminada depressa da circulação sanguínea e deve ser administrada uma dose importante a intervalos regulares para se obter uma acção anticoagulante eficiente, o que é frequentemente acompanhada com hemorragias anormais ou complicações como uma trombopenia.

Também, a possibilidade para administrar a heparina através de via oral teria um impacto realmente importante num bom número de casos clínicos do domínio cardiovascular.

Porém, devido à sua estrutura, a heparina aparece

como uma molécula de peso molecular alto e inclusivé uma forte densidade de cargas. Ela não pode por isso atravessar confortavelmente a barreira digestiva após administração através da via oral.

Do mesmo modo, a heparina administrada por via oral não é absorvida ao nível do tracto gastrointestinal e perde a sua actividade anticoagulante em ambiente ácido (Morton *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **9**, 321-335 (1981), Doutremepuich *et al.*, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **11** (3), (1985) 323-325). A estratégia utilizada consistiu no preenchimento da falta de absorção/actividade anticoagulante por um aumento importante da dose administrada.

Assim, estudos prévios colocaram em evidência que após administração oral ao homem de uma grande quantidade de heparina em solução (40 000 UI, ou entre 10 e 17 vezes a dose normalmente administrada por via intravenosa cada duas horas), é absorvida uma quantidade fraca ao nível digestivo e é distribuída no sangue. Adicionalmente, a actividade anticoagulante medida pelo teste do tempo de cefalina activada (TCA) é muito fraca (Baughman *et al.*, *Circulation*, **16**, (1998), 1610-1615). Da mesmo modo no homem, após administração por via oral de heparina de baixo peso molecular (HBPM), não se observou nenhuma actividade em protoplasma (Dryjski *et al.*, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2**, (1989), 188-192).

Considerou-se que as numerosas modificações quí-

micas da heparina e a preparação de diferentes formulações melhoram a biodisponibilidade da heparina após administração por via oral.

Numa primeira vez, alguns testes consistiram no estudo de modificações da estrutura da heparina (heparinas de fonte diferente, mais ou menos fragmentadas, até ao aparecimento das heparinas de baixo peso molecular).

As soluções foram preparadas em complexos de heparina com adjuvantes como a lisina, a espermina ou a glicina, de modo a diminuir a ionização da heparina. Após a administração oral, estas soluções apresentaram uma fraca absorção de heparina (Tidball *et al.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **111**, (1962), 713-715).

Soluções de sais ácidos de heparina foram também preparadas associando a heparina com os sais de sódio do ácido etileno diaminotetra-acético ou os sais biliares (Morton *et al.*, Int. J. Pharm., **9**, (1981), 321-335).

Foram também consideradas emulsões de óleo em água (H/E) ou soluções micelares de sais de mono-oleína destinados a aumentar a absorção da heparina (Taniguchi *et al.*, Int. J. Pharm., **4**, (1980), 219-228).

As soluções de propilenoglicol contendo heparina e dos compostos derivados da N-acilação do aminoácido aromático, o ácido 4-aminofenilbutírico, demonstraram uma

melhoria de absorção gastrointestinal e uma biodisponibilidade da heparina após administração oral a ratos e macacos (Leone-Bay *et al.*, *J. Controlled Red.*, **50**, (1998), 41-49).

Embora estas diferentes soluções de heparina (Tidball *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**, (1962), 713-715, Morton *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **9**, 321-335 (1981), Taniguchi *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **4**, (1980) 219-228 e Leone-Bay *et al.*, *J. Controlled Red.*, **50**, (1998) 41-49) permitiram, para além do mais, melhorar a absorção gastrointestinal da heparina, o efeito anticoagulante observado é muito mais fraco e de duração inferior ao obtido após a administração por via subcutânea para posologias muito largamente superiores. Além disso, o estatuto tóxico-farmacológico dos promotores de absorção e dos excipientes utilizados comprometem o sucesso destas formulações.

As drageias gastro-resistentes de heparina foram administradas a coelhos e observou-se uma fraca actividade anti-Xa plasmática (0,15 UI/mL.) entre a 2ª e a 4ª hora. Contudo, novamente, administrou-se doses muito importantes de heparina (15000 UI anti-Xa/kg) (Doutremepuich *et al.*, *Thérapie*, **39**, (1984), 147-152).

Outros trabalhos consistiram em tentativas para otimizar a absorção de heparina, e deste facto, do efeito terapêutico procurado. Esta nova etapa foi marcada pelo

fabrico de sistemas de administração de medicamentos, tais como os lipossomas e as micropartículas que permitiram colocar em cápsulas a heparina. Estas técnicas de encapsulamento utilizadas para as enzimas, os medicamentos e as hormonas fazem com que estas moléculas permaneçam mais tempo na circulação sanguínea do que quando elas estão sob a forma de fibra, devido à sua libertação progressiva através dos sistemas poliméricos e à protecção que estes últimos conferem considerando a deterioração enzimática (Couvreur *et al.*, *Drug Del. Rev.*, **10**, (1993), 141-162).

Os lipossomas foram também preparados e administrados a cães; foi observada uma absorção intestinal do princípio activo, mas verificou-se uma actividade biológica fraca considerando que foram administradas doses sempre extremamente importantes de heparina (500000 UI) (Ueno *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **30** (6), (1982), 2245-2247).

Finalmente, foi também desenvolvido microsferas compostas de aminoácidos condensados de modo térmico (Santiago *et al.*, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Mater.*, **19**, (1992) 514-515 e Santiago *et al.*, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Mater.*, **20**, (1993), 300-301). Neste último caso a partícula obtida, cujo tamanho está compreendido entre 0,5 e 10 μm , é denominada proteínóide. A sua administração oral a ratos e macacos permitiu concluir uma absorção da heparina ao nível intestinal; estes resultados promissores contam porém com três obstáculos

importantes. Em primeiro lugar, a actividade biológica da heparina só se manifesta ao máximo durante 90 minutos. Por outro lado, a actividade biológica foi obtida no rato para doses mais de 10 vezes superiores às utilizadas no homem por via parentérica. Finalmente, a actual numerosa pesquisa de imunização por via oral assenta no fenómeno de captura, pelos pratos de Peyer, de micropartículas carregadas em antigénos e cujo tamanho é compreendido entre 1 e 10 μm . Nestas condições, os proteínóides utilizados poderiam induzir um fenómeno imunoalérgico comprometendo a administração repetida destas partículas.

Os sistemas poliméricos são igualmente objecto de numerosos estudos. Assim, Yang et al., (J. Control. Rel., **60**, (1999) 269-277) prepararam micropartículas de heparina tendo por base unicamente polímero de ácido láctico e ácido glicólico (PLGA) com o objectivo de inibir a proliferação das células musculares lisas dos vasos sanguíneos aquando de um estudo *in vivo* (Yang et al., J. Control. Rel., **60**, (1999) 269-277). As micropartículas, fabricadas por uma técnica de nebulização (secagem por pulverização), apresentam um tamanho muito fraco (entre 3 e 9 μm). A libertação da heparina *in vitro* é muito lenta (entre 10 e 40 dias), o que é incompatível com uma administração oral para a qual o tempo de trânsito é na ordem de 24 a 48 horas.

A WO 96 28143 A descreve composições farmacêuticas sob a forma de micropartículas contendo os polipépti-

dos e designadamente a insulina como princípio activo. Estas partículas são formadas a partir de uma mistura de polímeros biodegradáveis (copolímero do ácido láctico e do ácido glicólico) e dos polímeros policatiónicos (poliamino-ácidos: poliarginina e poli-histidina ou quitosano).

A WO 92 11844 A descreve as micropartículas contendo um péptido ou uma proteína como princípio activo e uma mistura de polímeros formada por um polímero biodegradável (e.g. polímeros do ácido láctico, copolímeros do ácido láctico e do ácido glicólico, poliamidas, poli-anidridos) e por um polímero policatiónico (poliarginina, polilisina ou quitosano).

No entanto, todos estes testes utilizam doses muito importantes de heparina em relação à que é normalmente utilizada no homem em terapêutica. Do mesmo modo existe ainda uma necessidade para colocar à disposição dos pacientes, um sistema de administração que aumenta a absorção dos princípios activos, nomeadamente da heparina, após a administração oral e que permita administrar as referidos princípios activos a concentrações menos elevadas diminuindo assim os efeitos secundários adversos.

Porém, os inventores mostraram de modo surpreendente e inesperada ao nível da permeação de moléculas grandes através da barreira gastrointestinal, que os vectores particulados compreendendo uma matriz polimérica tendo por base uma mistura de um polímero biodegradável não

entérico e de um polímero policatiónico não entérico permitindo administrar por via oral quantidades de princípios activos, designadamente de heparina próximas das normalmente utilizadas através da via parentérica.

Do mesmo modo, a presente invenção tem como objecto vectores particulados destinados a melhorar a absorção oral de princípios activos, formados por uma matriz polimérica compreendendo pelo menos um polímero biodegradável associado a pelo menos um polímero policatiónico.

À luz da presente invenção, os polímeros biodegradáveis e os polímeros policatiónicos podem ser gastro-resistentes (entéricos) ou não.

Numa outra forma de realização da invenção o polímero biodegradável e o polímero policatiónico estão presentes em quantidade equivalente.

De modo vantajoso, o polímero biodegradável não entérico é seleccionado de entre o grupo constituído por poliésteres, designadamente os polímeros do ácido láctico, os copolímeros do ácido láctico e do ácido glocólico (PLGA), a poli- ϵ -caprolactona (PCL), os poli-anidridos, as poli(amidas), os poli(uretanos), os poli(carbonatos), os poli(acetatos), os poli(orto-ésteres) e os polímeros naturais (colagénio, polissacarídeos...).

De modo vantajoso, o polímero policationico é seleccionado de entre o grupo constituído pelos derivados da celulose, os copolímeros de ésteres dos ácidos acrílicos e metacrílicos comercializados pela firma Rhöm GmbH sob o nome de Eudragit® e mais particularmente os poliésteres do ácido metacrílico com uma proporção baixa de cloreto de metacrilato de trimetilamonioetilo (Eudragit® RS) ou uma proporção mais elevada de cloreto de metacrilato de trimetilamonioetilo (Eudragit® RL), o quitosano e seus derivados e a polilisina.

Numa forma de realização particularmente vantajosa da invenção, o polímero biodegradável ou é PCL, ou PLGA com o peso molecular dos referidos polímeros a estar compreendido entre 2000 e 100000.

Numa forma de realização de acordo com a invenção, os vectores particulados apresentam-se ou sob a forma de nanopartículas cujo diâmetro está compreendido entre 50 e 1000 nm, de preferência entre 200 e 400 nm, ou sob a forma de micropartículas cujo diâmetro está compreendido entre 1 e 1000 µm, de preferência entre 50 e 200 µm.

De acordo com a invenção, a matriz polimérica pode compreender uma ou várias substâncias seleccionadas de entre o grupo constituído de polímeros entéricos, de agentes tensioactivos e de substâncias solúveis em água ou solúveis em gordura.

Numa forma de realização da invenção, o princípio activo é seleccionado de entre o grupo constituído por heparina e produtos semelhantes, as heparinas de baixo peso molecular (HBPM) e produtos semelhantes, os péptidos e as proteínas, designadamente a insulina, a ciclosporina, o oligonucleótidos anti-sentido, o ADN e a hormona de de crescimento.

Numa outra forma de realização da invenção, o vector particulado permite a administração por via oral de heparina padrão a uma dose compreendida entre 2000 UI e 20000 UI/dia e a HBPM a uma dose compreendida entre 600 UI e 4200 UI/dia.

A presente invenção tem ainda como objecto uma composição farmacêutica que contém um vector particulado como descrito anteriormente em associação com qualquer excipiente farmacêuticamente aceitável.

As composições podem ser utilizadas uma ou várias vezes por dia, sob todas as formas adaptadas à administração oral, nomeadamente sob a forma de cápsulas, de comprimidos, de grânulos, de saquetas ou de liofilizados.

As composições de acordo com a invenção permitem administrar os princípios activos a doses equivalentes a aproximadamente cerca de 1 a 10 vezes da dose utilizada por via parentérica. Tais vectores permitem suprimir as inconveniências da via parentérica (esterilização do

medicamento, dor no local de injeção, angústia do paciente, risco de infecção, número de pontos de injeção limitados). Eles evitam ainda, como é nos casos por via oral, administrar algumas doses muito importantes de princípios activos uma vez que os princípios activos são utilizados a uma dose equivalente ou mesmo ligeiramente superior à utilizada classicamente por via intravenosa, num máximo de 10 vezes, de preferência de 1 a 3 vezes da referida dose.

Por outro lado, a utilização de polímeros considerados como biocompatíveis (biodegradáveis e/ou não biodegradáveis) é uma garantia da ausência de toxicidade das partículas anteriormente mencionadas.

Inesperadamente, os vectores particulados de acordo com a invenção permitem ainda a obtenção de uma acção mais prolongada que a administração de uma dose semelhante em solução administrada por via intravenosa, considerando que é reconhecido que as doses administradas por via oral devem frequentemente ser extensivamente superiores às doses administradas por via intravenosa para poderem exercer a sua actividade, devido às perdas em princípio activo causado pela sua permanência no tracto gastrointestinal (pH ácido do estômago, enzimas, várias secreções, primeira passagem hepática...).

Conforme a invenção, os vectores particulados podem ser preparados por qualquer método conhecido dos especialistas na matéria. Pode mencionar-se o método de

preparação como um exemplo do método de preparação por emulsificação e evaporação do solvente tal como o descrito por Alex *et al.*, (J. Microencapsulation, **7** (3), 347-355 (1990)). Outros métodos podem igualmente ser considerados nomeadamente a nebulização (secagem por pulverização), o revestimento e a extrusão.

Os exemplos e as figuras que se seguem ilustram a invenção sem no entanto a limitar.

A figura 1 ilustra a actividade biológica da heparina determinada pelos tempos de cefalina activada após a administração oral de micropartículas de heparina preparadas a partir de uma mistura de polímeros Eudragit® RS/PLGA na proporção (1/1) de acordo com o método operativo do exemplo 1 e administradas de acordo com método operativo do exemplo 9.

A figura 2 ilustra a heparina após a administração de nanopartículas de heparina preparadas a partir de uma mistura de polímeros Eudragit® RL/PCL na proporção (1/1) de acordo com o método operativo do exemplo 1 e administradas de acordo com método operativo do exemplo 9.

A figura 3 ilustra a cinética da glicemia induzida por uma administração de 2 g de glicose administrada por via oral, 4 horas após a administração oral de nanopartículas de insulina preparadas de acordo com o método operativo do exemplo 10 (virgens = ratos não

tratados; ins = ratos tratados por nanopartículas de acordo com a invenção).

A figura 4 ilustra a cinética da glicemia induzida por uma administração de 2 g de glicose administrada por via oral, 8 horas após a administração oral de nanopartículas de insulina preparadas de acordo com o método operativo do exemplo 10 (virgens = ratos não tratados; ins = ratos tratados por nanopartículas de acordo com a invenção).

Exemplo 1: Preparação de vectores particulados contendo heparina (micropartículas)

A solução de heparina padrão ou baixo peso molecular (1 mL, 5000 UI) foi emulsionada sob agitação magnética durante 3 min. (500 rpm) numa solução de diclorometano (10 mL) contendo o polímero ou a mistura de polímeros (250 mg). Ver-teu-se de seguida esta primeira emulsão (água/óleo) num volume de água (1500 mL) contendo um agente tensioactivo, o álcool polivinílico (0,1% grau de hidrólise 88%), permitindo a obtenção sob agitação mecânica (2000 voltas/min.) de uma segunda emulsão de água/óleo/água. Após 2 horas de agitação, a precipitação das gotinhas dispersas é obtida depois a evaporação do solvente. As micropartículas do polímero deste modo obtidas foram de seguida isoladas através de filtração. As partículas apresentaram um tamanho médio de 150 μm .

Exemplo 2: Preparação de vectores particulados contendo heparina e gelatina A (micropartículas)

Procedeu-se de acordo com o exemplo 1 com a adição de gelatina A (0,5%) na solução de heparina.

Exemplo 3: Preparação de vectores particulados contendo heparina e cloreto de sódio (micropartículas)

Procedeu-se de acordo com o exemplo 1 com a adição de NaCl (0,2%) na solução de heparina.

Exemplo 4: Preparação de vectores particulados contendo heparina (nanopartículas)

A solução de heparina padrão ou baixo peso molecular (1 mL, 5000 UI) foi emulsionada com o auxílio de uma sonda de ultra-sons durante 3 min. numa solução de diclorometano (10 mL) contendo o polímero ou a mistura de polímeros (250 mg). Verteu-se de seguida esta primeira emulsão (água/óleo) num volume de água (200 mL) contendo um agente tensioactivo, o álcool polivinílico (0,1%), permitindo obter por homogeneização sob pressão (homogeneizador de fileira) uma segunda emulsão água/óleo/água. Após 3 minutos de cisalhamento, a agitação foi terminada e o solvente foi evaporado da suspensão coloidal através de um evaporador sob pressão reduzida, provocando-se a formação de nanopartículas do polímero em suspensão na água. A

suspensão das nanopartículas foi lavada 3 três por centrifugação (25000 g). Esta suspensão pode ser utilizada tal e qual ou liofilizada. As partículas apresentaram um tamanho médio de 250 nm.

Exemplo 5: Preparação de vectores particulados contendo heparina e gelatina A (nanopartículas)

Procedeu-se de acordo com o exemplo 4 com a adição de gelatina A (0,5%) na solução de heparina.

Exemplo 6: Preparação de vectores particulados contendo heparina e cloreto de sódio (nanopartículas)

Procedeu-se de acordo com o exemplo 4 com a adição de NaCl (0,2%) na solução de heparina.

Exemplo 7: Caracterização físico-química das partículas

As micropartículas e nanopartículas foram preparadas de acordo com os procedimentos operativos dos exemplos 1 a 6 e contêm no total 0,25 g de polímeros ou mistura de polímeros.

As características para as micropartículas estão compiladas na tabela 1 como sendo a média de 3 ensaios (média \pm desvio padrão).

As características para as nanopartículas estão compiladas na tabela 2 como sendo a média de 4 ensaios (média \pm desvio padrão).

A carga em princípio activo (expressa em percentagem e em UI de heparina/grama de polímero) em e/ou sobre as referidas partículas foi determinada por um método colorimétrico validado com uma solução de Azul II no caso da heparina padrão não fraccionada e por nefelometria no caso de HBPM (heparina de baixo peso molecular).

O diâmetro das micropartículas e das nanopartículas foi obtido pelos métodos clássicos de difracção/difusão de luz conhecidos dos especialistas na matéria.

O potencial de superfície das nanopartículas foi determinado através de electroforese de laser.

Os resultados mostram que a técnica de fabrico é muito reprodutível.

Para as micropartículas e as nanopartículas preparadas somente com um polímero biodegradável, as taxas de incorporação de heparina são baixas, o que exigiria, mesmo que se suponha uma absorção, quantidades muito elevadas e incompatíveis de partículas (na ordem de vários grama numa única administração).

Por outro lado, as micropartículas de acordo com a invenção apresentam uma taxa de incorporação suficiente para permitir administrar quantidades compatíveis de partículas.

Tabela 1

Tipo de polímero Quantidade = 0,25 g	Taxa de incorporação		Tamanho médio (m)
	%	UI/g de polímero	
Eudragit®RS PO ^a	49,29 ± 4,03	9952 ± 798,1	96,23
Eudragit®RL PO ^a	79,89 ± 3,45	15956 ± 687,6	79,76
PCL ^a	23,55 ± 3,51	4566 ± 699,7	128,33
PLGA ^a	26,81 ± 3,76	1929 ± 160,9	125,16
PCL/PLGA (1/1) ^a	17,52 ± 4,69	3506 ± 928,8	82,04
RS/RL (1/1) ^a	66,59 ± 1,54	13307 ± 303,1	88,07
RS/RL/PLGA (1/1/2) ^b	45,13 ± 2,85	8984 ± 568,7	71,07
RS/PLGA (1/1) ^b	52,48 ± 4,17	10517 ± 908,2	86,98
RL/PLGA (1/1) ^b	63,79 ± 3,95	12752 ± 785,3	128,51
RS/RL/PCL(1/1/2) ^b	40,39 ± 2,42	8126 ± 508,7	104,38
RS/PCL (1/1) ^b	36,27 ± 3,72	7277 ± 722,0	129,36
RL/PCL (1/1) ^b	45,16 ± 2,13	9032 ± 466,7	103,45
RS/gelatina A (5%) ^a	66,63 ± 4,06	13323 ± 811,2	123,64
RS/NaCl (2%) ^a	16,40 ± 2,41	3186 ± 394,6	84,99
RS/gelatina B (5%) ^a	46,31 ± 1,54	9260 ± 299,9	80,40
PCL/gelatina A (5%) ^a	57,96 ± 4,73	11577 ± 928,4	201,04
PCL/NaCl (2%) ^a	17,09 ± 1,90	3416 ± 377,5	90,89
PCL/gelatina B (5%) ^a	24,08 ± 2,72	4826 ± 536,7	124,96
PLGA/gelatina A (5%) ^a	58,71 ± 3,94	11735 ± 786,8	282,24
PLGA/NaCl (2%) ^a	22,59 ± 3,34	4517 ± 666,1	107,97
PLGA/gelatina B (5%) ^a	37,51 ± 2,41	7505 ± 491,6	130,43

^a Exemplos comparativos ^b Exemplos de acordo com a invenção

Tabela 2

Tipo de polímero Quantidade = 0,25 g	Heparina encapsulada em UI/g de polímero (%)	Potencial de superfície (mV)	Tamanho (nm) (polidispersados)
Eudragit®RL ^a	19477 ± 490,2 (97,38 ± 2,45)	-38,8 ± 2,4	265,7 ± 8,22 (0,102)
Eudragit®RS ^a	11825 ± 139,6 (59,13 ± 0,71)	-22,4 ± 0,45	268,5 ± 15,83 (0,110)
PCL ^a	1673 ± 208,8 (8,36 ± 1,06)	-1,6 ± 0,22	285,3 ± 9,92 (0,064)
PLGA ^a	2792 ± 800,5 (13,97 ± 4,01)	-4,5 ± 0,07	266,5 ± 4,00 (0,058)
RS/PLGA (1/1) ^b	7101 ± 430,9 (35,53 ± 2,15)	-17,3 ± 1,35	273,4 ± 7,37 (0,083)
RL/PLGA (1/1) ^b	9752 ± 720,8 (48,78 ± 3,60)	-37,2 ± 3,30	268,9 ± 8,13 (0,10)
RS/RL/PLGA (1/1/2) ^b	7498 ± 138,4 (37,55 ± 0,69)	-30,7 ± 2,02	275,4 ± 3,41 (0,074)
RS/PCL (1/1) ^b	5657 ± 324,0 (28,30 ± 1,61)	-20,0 ± 0,67	285,9 ± 5,88 (0,07)
RL/PCL (1/1) ^b	10663 ± 320,6 (53,36 ± 1,64)	-33,6 ± 1,93	303,6 ± 3,49 (0,086)
RS/RL/PCL(1/1/2) ^b	7645 ± 588,4 (38,25 ± 2,94)	-29,9 ± 0,39	295,0 ± 4,34 (0,088)
RS/RL ^a	14287 ± 448,3 (71,44 ± 2,21)	-35,7 ± 1,94	269,6 ± 7,07 (0,088)
PCL/PLGA ^a	853 ± 158,4 (4,26 ± 0,79)	2,5 ± 0,38	264,9 ± 0,61 (0,061)
RS/gelatina A ^a	11891 ± 741,2 (59,43 ± 3,42)	-18,6 ± 1,21	279,9 ± 3,12 (0,099)
PCL/gelatina A ^a	7414 ± 870,4 (37,04 ± 4,35)	-2,58 ± 0,23	284,4 ± 3,90 (0,091)
PLGA/gelatina A ^a	8533 ± 701,7 (41,31 ± 3,51)	-4,4 ± 0,31	274,4 ± 3,22 (0,073)

^a Exemplos comparativos ^b Exemplos de acordo com a invenção

Exemplo 8: Quantidade de heparina libertada *in vitro*

A actividade biológica de heparina encapsulada após terem sido libertadas as partículas de acordo com os exemplos 1 a 6 foi determinada por um método cronométrico (TCA, tempos de cefalina activada; kit C.K. Prest®, Diagnostica Stago) e um método cromogénico (anti-Xa activada; kit Stachrom® Heparin, Diagnostica Stago) de acordo com a instruções do fabricante.

Os resultados obtidos mostram que os valores obtidos para a quantidade de heparina libertada são idênticos pelos dois métodos, o que confirma que a heparina manteve sua actividade biológica após o encapsulamento.

Exemplo 9: Estudo *in vivo* após administração oral em coelhos

Os resultados estão apresentados nas figuras 1 e 2.

As drageias contendo as partículas dos polímeros de heparina preparadas de acordo com os exemplos 1 a 6 a partir de 250 mg de polímero ou misturas de polímeros foram administradas numa dose única, 2000 UI para a heparina padrão, 600 UI para a HBPM aos coelhos em jejum durante 12 horas. As colheitas de sangue (500 µL) foram efectuadas ao tempo T₀ e a tempos regulares ao nível da veia externa da orelha. Após centrifugação de todas as amostras de sangue a

7000 g durante 8 min., o tempo de cefalina activada ou a actividade anti-Xa foram determinados como indicado no exemplo 8.

Inesperadamente, na administração única por via oral, e com uma concentração de 20 a 250 vezes mais baixa em princípio activo que os utilizados do estado anterior da técnica [2000 UI de heparina considerando que os outros trabalhos publicados fazem estados de doses que vão desde 40000, 60000 a 90000 todas as 8 horas durante 5 dias (Baugham, Proceed, Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., **26**, (1999) 4) até 500000 UI (Ueno *et al.*, Chem. Pharm., **30** (6), (1982) 2245-2247)], as partículas de heparina preparadas de acordo com a presente invenção aumentam de um modo significativo e prolongam o tempo de coagulação.

Por outro lado, após a administração oral de micropartículas ou nanopartículas preparadas somente a partir de polímeros biodegradáveis (PLGA, PCL...), não se constatou nenhuma absorção de heparina padrão. Após administração oral de micropartículas ou nanopartículas preparadas somente de polímero não biodegradável (Eudragit® RL, Eudragit®RS) não se observou nenhuma absorção de heparina padrão.

Deste modo os vectores particulados de heparina da presente invenção permitem a administração por via oral de doses praticamente equivalentes às administradas actualmente ao homem por via intravenosa e subcutânea,

enquanto asseguram uma eficiência prolongada do princípio activo.

Exemplo 10: Preparação de vectores particulados que contêm insulina (nanopartículas)

A solução de insulina é emulsionada com o auxílio de uma sonda de ultra-sons durante 30 segundos numa solução de diclorometano contendo a mistura de polímeros (250 mg).

Verteu-se de seguida esta primeira emulsão água/óleo num volume de água (40 mL) contendo um agente tensioactivo, o álcool polivinílico (0,1%) e emulsionou-se com o auxílio de uma sonda de ultra-sons durante 1 minuto, obtendo-se deste modo uma segunda emulsão de água/óleo/água.

O solvente orgânico foi de seguida evaporado com o auxílio de um evaporador sob pressão reduzida, proporcionando a formação do nanopartículas. A suspensão coloidal foi centrifugada durante 30 minutos (42000 g), eliminou-se o sobrenadante e as nanopartículas foram colocadas numa suspensão em água e utilizadas tal qual. As partículas apresentaram um tamanho médio de 350 nm.

Exemplo 11: Estudo *in vivo* após administração oral a ratos diabéticos de nanopartículas de insulina

Os resultados estão apresentados nas figuras 3 e 4.

A suspensão de nanopartículas insulina preparadas de acordo com o exemplo 10 foi administrada por via oral numa dose única (100 UI/kg) em ratos tornados diabético por administração de estreptozocina e com um jejum de 12 horas.

Um teste de hiperglicemia provocado (2 g de glicose administrados por via oral) foi efectuado 4 e 8 horas após administração oral das nanopartículas. As colheitas de sangue foram efectuadas ao tempo T_0 e a tempos regulares para o nível da veia da cauda. A glicemia e a insulinemia são determinadas para todas as amostras de sangue.

Inesperadamente, após a administração única através da via oral, as partículas de insulina preparadas de acordo com a presente invenção diminuíram de um modo significativo a glicemia.

Do mesmo modo, observou-se um aumento da insulinemia.

Lisboa, 4 de Julho de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Vectores particulados destinados a melhorarem a absorção oral de princípios activos, em que os referidos vectores são formados por uma matriz polimérica contendo pelo menos um polímero biodegradável associado a pelo menos um polímero policatiónico.

2. Vectores particulados de acordo com a reivindicação 1, em que o polímero biodegradável não entérico é seleccionado do grupo constituído por poliésteres, designadamente os polímeros do ácido láctico, os co-polímeros do ácido láctico e o ácido glicólico (PLGA), a poli- ϵ -caprolactona (PCL) e os polianídridos, as poli(amidas), os poli(uretanos), os poli(carbonatos), os poli(acetatos), os poli(orto-ésteres) e os polímeros naturais.

3. Vectores particulados de acordo com a reivindicação 2, em que o polímero biodegradável não entérico é PCL ou PLGA, o peso molecular dos referidos polímeros está compreendido entre 2000 e 100000.

4. Vectores particulados de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, em que o polímero policatiónico é seleccionado de entre o grupo constituído por derivados da celulose, os copolímeros de ésteres dos ácidos acrílicos e metacrílicos comercializados pela firma Rhöm GmgH sob o a designação Eudragit® e mais particularmente os

poliésteres do ácido metacrílico com uma pequena proporção de cloreto de metacrilato de trimetilamonioetilo (Eudragit®RS) ou uma proporção mais significativa de cloreto de metacrilato de trimetilamonioetilo (Eudragit®RL), o quitosano e seus derivados e a polilisina.

5. Vectores particulados de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, em que eles estão presentes sob a forma de nanopartículas ou de micropartículas.

6. Vectores particulados de acordo com a reivindicação 5, em que eles estão presentes sob a forma de nanopartículas cujo diâmetro está compreendido entre 50 e 1000 nm.

7. Vectores particulados de acordo com a reivindicação 6, em que eles estão presentes sob a forma de nanopartículas cujo diâmetro está compreendido entre 200 e 400 nm.

8. Vectores particulados de acordo com a reivindicação 5, em que eles estão presentes sob a forma de micropartículas cujo diâmetro está compreendido entre 1 e 1000 μm .

9. Vectores particulados de acordo com a reivindicação 8, em que eles estão presentes sob a forma de micropartículas cujo diâmetro está compreendido entre 50 e 200 μm .

10. Vectores particulados de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, em que eles compreendem ainda quer uma ou diversas substâncias seleccionadas de entre o grupo compreendendo os polímeros entéricos quer as substâncias hidrossolúveis ou lipossolúveis.

11. Vectores particulados de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, em que o princípio activo é seleccionado de entre heparina e os produtos semelhantes, as heparinas de baixo peso molecular e substâncias semelhantes, os péptidos e as proteínas.

12. Vectores particulados de acordo com a reivindicação 11, em que o princípio activo é a heparina.

13. Composição farmacêutica caracterizada por conter pelo menos um vector particulado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, em associação com todos os excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

14. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13, em que ela é preparada sob a forma adaptada para a administração oral.

15. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 14, em que ela é preparada sob a forma de drageias, de comprimidos, de grânulos, de saquetas ou de liofilizados.

16. Utilização de vectores particulados de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12 para a preparação de um medicamento.

17. Utilização de vectores particulados de acordo com a reivindicação 16 para a preparação de um medicamento destinado à administração por via oral das proteínas, dos péptidos, da heparina e de substâncias semelhantes, e das heparinas de baixo peso molecular e de substâncias semelhantes.

Lisboa, 4 de Julho de 2008

Figura 1

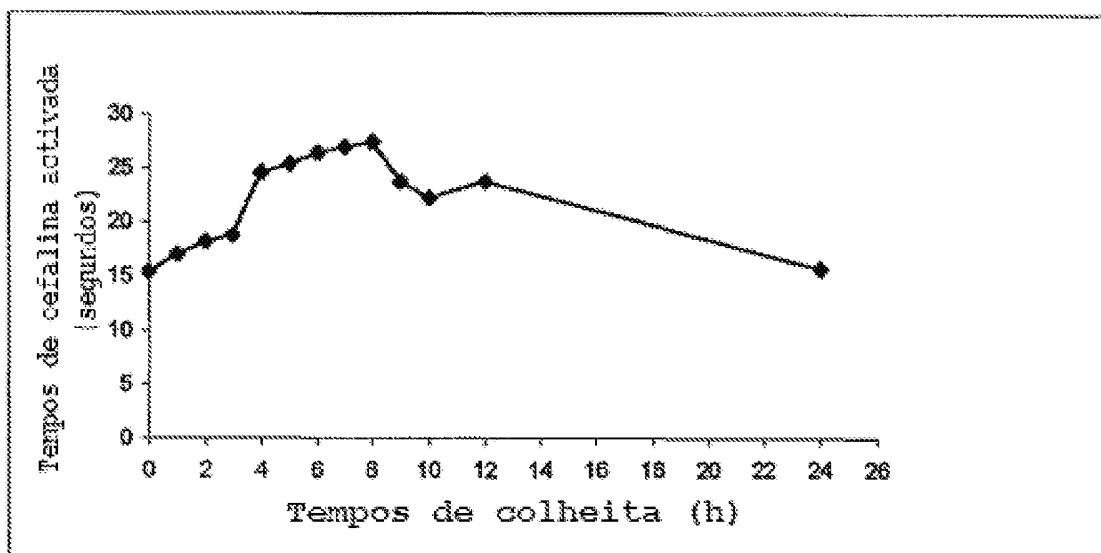
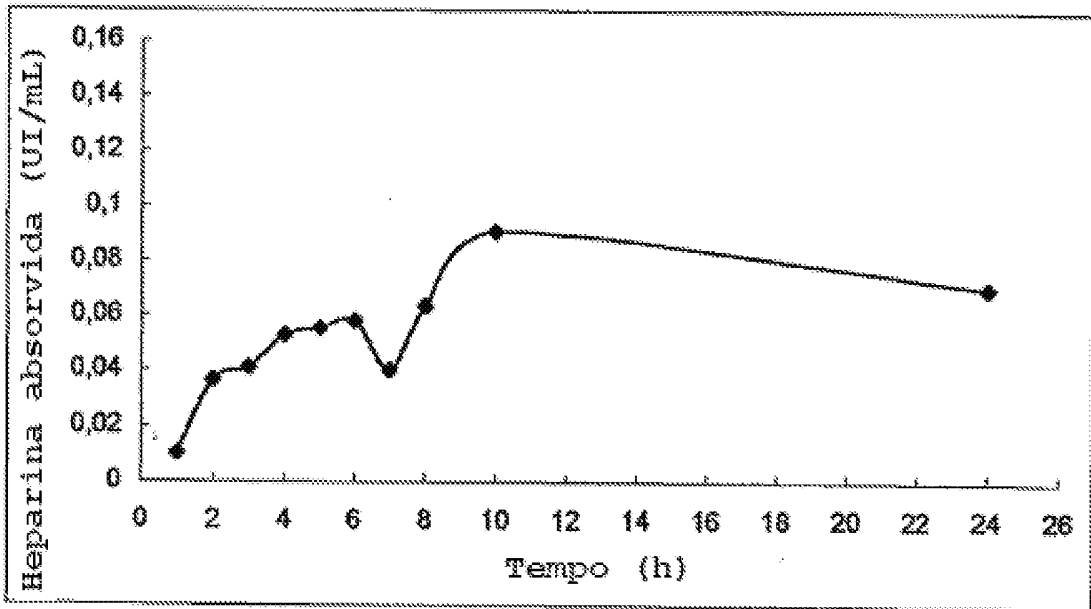


Figura 2



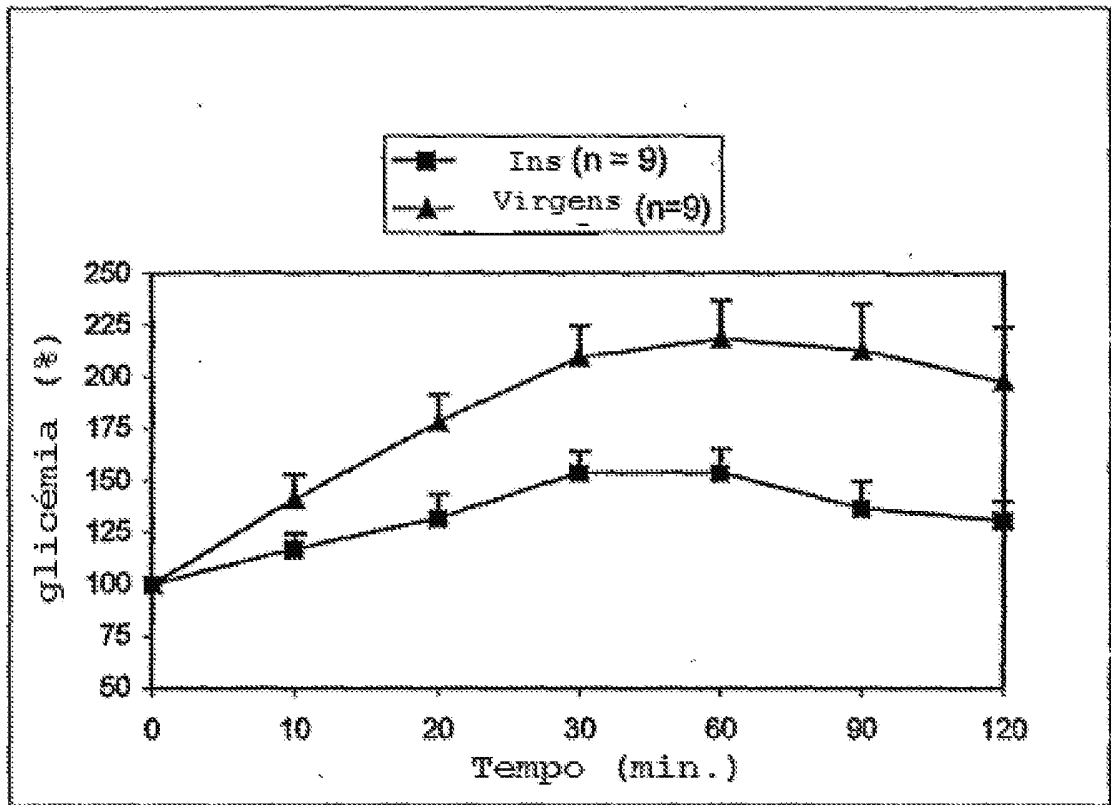


Figura 3

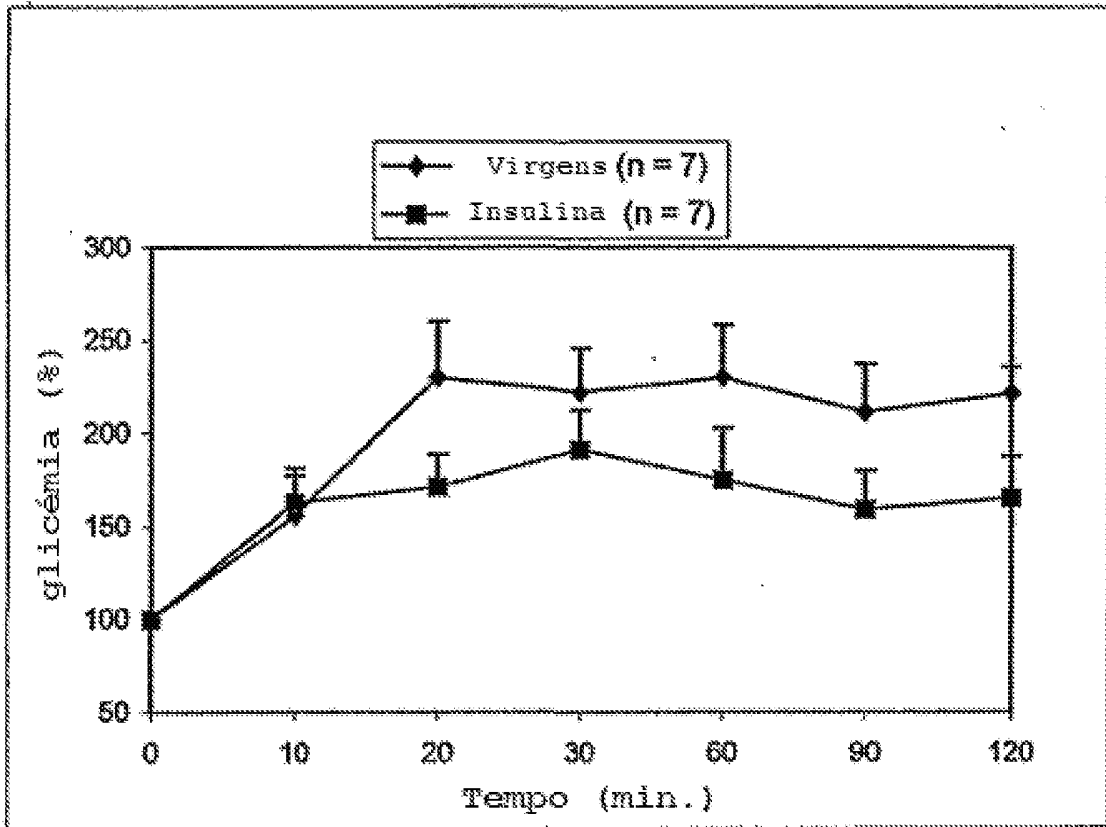


Figura 4

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 8628143 A
- WO 9211844 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- MICHEL C. et al. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1991, vol. 43, 1-5
- DAMGE C. et al. *Diabètes*, 1988, vol. 37, 246-251
- COUVREUR P. et al. *Actis Pharm. Technol.*, 1980, vol. 26, 220-222
- FORD J. et al. *Int. J. Pharm.*, 1999, vol. 183, 3-6
- MORTON et al. *Int. J. Pharm.*, 1981, vol. 9, 321-335
- DOUTREMEPUICH et al. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 1985, vol. 11 (3), 323-325
- BAUGHMAN et al. *Circulation*, 1998, vol. 98, 1610-1615
- BRYJSKI et al. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1989, vol. 2, 168-192
- TIDBALL et al. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1982, vol. 111, 713-715
- MORTON et al. *Int. J. Pharm.*, 1981, vol. 9, 321-335
- TANIGUCHI et al. *Int. J. Pharm.*, 1980, vol. 4, 219-228
- LEONE-BAY et al. *J. Controlled Rel.*, 1986, vol. 50, 41-49
- TANIGUCHI et al. *Int. J. Pharm.*, 1980, vol. 4, 219-228
- LEONE-BAY et al. *J. Controlled Rel.*, vol. 50, 41-49
- LEONE-BAY et al. *J. Controlled Rel.*, vol. 50, 41-49
- DOUTREMEPUICH et al. *Thérapie*, 1984, vol. 39, 147-152
- COUVREUR et al. *Drug Del. Rev.*, 1993, vol. 10, 141-152
- UENO. *Chem. Pharm. Bull.*, 1962, vol. 30 (6), 2245-2247
- SANTIAGO et al. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Mater.*, 1992, vol. 19, 514-515
- SANTIAGO et al. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 1993, vol. 20, 300-301
- YANG et al. *J. Control. Rel.*, 1999, vol. 63, 269-277
- ALEX et al. *J. Microencapsulation*, 1990, vol. 7 (3), 347-355
- BAUGHMAN. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 1995, vol. 25, 4
- UENO et al. *Chem. Pharm.*, 1982, vol. 30 (6), 2245-2247