



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0706949-9 A2**

(22) Data de Depósito: 23/01/2007
(43) Data da Publicação: 12/04/2011
(RPI 2101)



(51) *Int.Cl.:*

A61K 9/51
A61K 9/62
A61K 31/436
A61K 31/4523
A61K 31/7048

(54) Título: **MICROESFERAS, MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS QUE COMPREENDEM UMA PLURALIDADE DE NANOCÁPSULAS ACOMODADAS EM UM POLÍMERO FORMADOR DE GEL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA AUMENTAR A BIODISPONIBILIDADE DE UM AGENTE LIPOFÍLICO NO CORPO DE UM INDIVÍDUO HUMANO E MÉTODO DE TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO PARA UMA CONDIÇÃO PATOLÓGICA QUE REQUER UM NÍVEL EFICAZ AO SANGUE DE UM AGENTE ATIVO**

(30) Prioridade Unionista: 23/01/2006 US 60/760,935

(73) Titular(es): YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT
COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM

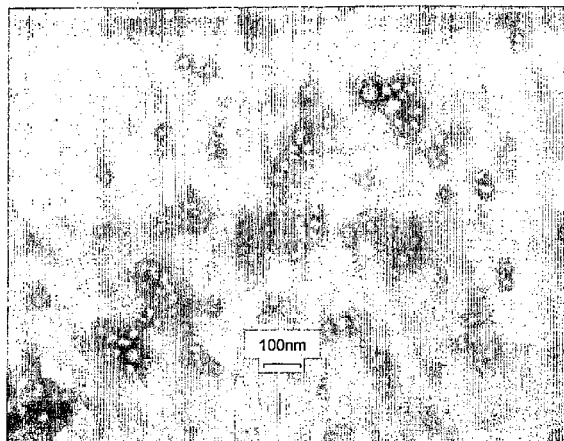
(72) Inventor(es): ALONA ROM, SHIMON BENITA, TAHER
NASSER

(74) Procurador(es): David Nascimento Advogados
Associados

(86) Pedido Internacional: PCT IL07000084 de 23/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/083316 de 26/07/2007

(57) Resumo: MICROESFERAS, MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS QUE COMPREENDEM UMA PLURALIDADE DE NANOCÁPSULAS ACOMODADAS EM UM POLÍMERO FORMADOR DE GEL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA AUMENTAR A BIODISPONIBILIDADE DE UM AGENTE LIPOFÍLICO NO CORPO DE UM INDIVÍDUO HUMANO E MÉTODO DE TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO PARA UMA CONDIÇÃO PATOLÓGICA QUE REQUER UM NÍVEL EFICAZ AO SANGUE DE UM AGENTE ATIVO A presente invenção apresenta microesferas que compreendem uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero formador de gel, em que a pluralidade de nanocápsulas compreende um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-hidrofílico e um envoltório de revestimento polimérico. A invenção também apresenta um método de preparação das microesferas da invenção, composições farmacêuticas que compreendem a mesma, bem como métodos de uso das microesferas, especificamente em aplicações terapêuticas cosméticas e de diagnóstico.



MICROESFERAS, MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS QUE COMPREENDEM UMA PLURALIDADE DE NANOCÁPSULAS ACOMODADAS EM UM POLÍMERO FORMADOR DE GEL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA AUMENTAR A BIODISPONIBILIDADE DE UM AGENTE LIPOFÍLICO NO
5 CORPO DE UM INDIVÍDUO HUMANO E MÉTODO DE TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO PARA UMA CONDIÇÃO PATOLÓGICA QUE REQUER UM NÍVEL EFICAZ AO SANGUE DE UM AGENTE ATIVO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a sistemas de
10 aplicação para agentes ativos, preferivelmente para a ingestão.

TÉCNICA ANTERIOR

O que segue é uma lista da técnica anterior que é considerada como pertinente para descrever o estado da
15 técnica no campo da invenção. O reconhecimento destas referências aqui será feito algumas vezes pela indicação de seu número dentro de parênteses da lista abaixo.

1. Holm R, Porter CJH, Edwards Ga, Mullertz A, Kristensen HG and Charman WN. Examination of oral absorption and
20 lymphatic transport of halofantrine in a triple-cannulated canine model after administration in self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) containing structured triglycerides. Eur. J. Pharm. Sci. 20:91-97 (2003).

2. Driscoll CM. Lipid-based formulations for intestinal
25 lymphatic delivery. Eur J Pharm Sci. 15:405-15. (2002).

3. Tamura S, Ohike A, Ibuki R, Amidon GL, Yamashita S. Tacrolimus is a class II low-solubility high-permeability drug: the effect of P-glycoprotein efflux on regional permeability of tacrolimus in rats. J Pharm Sci. 91:719-29.
30 (2002).

4. Hauss DJ, Fogal SE, Ficorilli JV, Price CA, Roy T, Jayaraj AA, Keirns JJ. Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a

- poorly water-soluble LTB₄ inhibitor. J. Pharm. Sci. 87:164-9 (1998).
5. EP 480,729, Haibung L, Soonhong Y. Microencapsulation for controlled oral drug delivery system.
- 5 6. U.S. 5,965,160, Benita S, et al. Self-emulsifiable formulation producing an oil-in-water emulsion.
7. Cook RO, Pannu RK, Kellaway IW. Novel sustained release microspheres for pulmonary drug delivery. J Control Release. 104:79-90. (2005).
- 10 8. Khoo SM, Humberstone. AJ, Porter CJH, Edwards GA, and Charman WN. Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. Int. J. Pharm. 167:155-164 (1998).
9. Christensen, K.L., et al. Preparation of redisperible dry emulsions by spray drying. Intl. J. Pharm. 212:187-194 (2001).
- 15 10. Honbo T, Kobayashi M, Hane K, Hata T, Ueda Y. The oral dosage form of FK-506. Transplant. Proc. 19 (Suppl 6): 17-22 (1987).
- 20 11. Shiinada T, Terada A, Yokogawa K, Kaneko H, Nomura M, Kaji K, Kaneko S, Kobayashi K, Miyamoto K. Lowered blood concentration of tacrolimus and its recovery with changes in expression of CYP3A and P-glycoprotein after high-dose steroid therapy. Transplantation. 74:1419-24 (2002).
- 25 12. Uno T, Kazui T, Suzuki Y, Hashimoto H, Suzuki K, Muhammad BA. Pharmacokinetic advantages of a newly developed tacrolimus oil-in-water-type emulsion via the enteral route. Lipids. 34: 249-54 (1999).
13. U.S. 6,884,433, Yamashita K., et al. Sustained release formulation containing tacrolimus.
- 30 14. Manjunath et al., Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration, Journal

of Controlled Release 107 (2005) 215-228.

15. Swartz M.A. The physiology of the lymphatic system, Adv. Drug Deliv. Rev. 50 (2001) 3- 20.

16. Jani, P.U., et al., Uptake and translocation of latex
5 nanospheres and microspheres after oral administration to rats, J. Phann. Pharmacol. 41 (1989) 809- 812.

17. Florence D. Evaluation of nano- and microparticles uptake by the gastrointestinal tract, Adv. Drug Deliv. Rev. 34 (1998) 221- 233.

10 18. Nishioka Y., et al., Lymphatic targeting with nanoparticulate system, Adv. Drug Deliv. Rev. 47 (2001) 55-64.

19. US 2003/0147965, Bassett M, Jacob J. and Ensore D. Methods and products useful in the formation and isolation of
15 microparticles.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os avanços recentes no projeto e na aplicação de drogas conduziram ao desenvolvimento de um número crescente de moléculas de drogas altamente lipofílicas que podem ser
20 substratos para o transporte linfático intestinal. No entanto, estas drogas exibem uma pobre biodisponibilidade oral devido ao efluxo de P-glicoproteína de baixa dissolução ou ao metabolismo de CYP3A4 antes da absorção no trato gastrointestinal, limitando desse modo a sua disponibilidade.

25 A formulação farmacêutica adequada de tais drogas continua sendo um desafio que ainda não foi solucionado completamente. É bem sabido que os lipídeos têm a capacidade de intensificar o transporte linfático de drogas hidrofóbicas, reduzindo desse modo a depuração da droga
30 resultante do metabolismo de primeira passagem hepático. Isto melhora a absorção da droga, os perfis de biodisponibilidade, a atividade, e reduz a toxicidade. O sucesso comercial de sistemas de aplicação de droga auto-emulsificantes (SEDDS)

tais como Neoral® (ciclosporina A), Norvir® (ritonavir) e Fortovase® (saquinavir) aumentaram o interesse em tais sistemas de aplicação baseados em emulsão promissores para melhorar a biodisponibilidade oral de drogas lipofílicas (1).

5 Acredita-se que os SEDDS que se espalham como gotas finas de óleo no trato gastrointestinal intensificam a biodisponibilidade ao promover o transporte linfático das drogas lipofílicas. Realmente, recentemente foi demonstrado que a extensão do transporte linfático através do duto
10 torácico era 27,4% da dose de halofantrine para os animais dosados com SMEDDS de triglicerídeo estruturado (1). Além disso, foi relatado recentemente que, sob determinadas circunstâncias, os elementos linfáticos podem prover a rota primária de absorção da droga e conduzir à concentração da
15 droga na linfa por 5 a 10.000 vezes mais do que no plasma sistêmico (2). Os avanços recentes no projeto e na aplicação da droga também conduziram ao desenvolvimento de um número crescente de moléculas de drogas altamente lipofílicas que podem ser substratos para o transporte linfático intestinal.

20 Há um aumento no interesse no papel dos elementos linfáticos na determinação dos perfis de absorção e biodisponibilidade da droga, atividade e toxicidade. Por exemplo, um corpo crescente de evidência mostrou que determinados lipídeos têm a capacidade de inibir o metabolismo pré-sistêmico da droga e
25 o efluxo de droga mediado por p-glicoproteína (mediado por P-gp pela parede do intestino (3).

O pedido de patente EP 480.729 (4) descreve um método de microencapsulação para a administração oral de uma droga dispersa em uma gota de óleo. A gota de óleo é
30 encapsulada ao utilizar um polissacarídeo que tem a capacidade de quelação de metal e um polímero solúvel em água. A encapsulação impede que a droga seja liberada no estômago, enquanto propicia a liberação rápida no intestino

delgado. Uma vez que a droga na gota de óleo é absorvida preferencialmente pela absorção linfática, ela é protegida contra a degradação pelo metabolismo de primeira passagem hepático.

5 A patente norte-americana 5.965.160 (5) descreve uma formulação oleosa auto-emulsificante (SEOF) que pode conter uma droga hidrofóbica, que compreende um componente de óleo e um tensoativo. A SEOF é caracterizada pelo fato que o componente de óleo compreende um veículo oleoso e um lipídeo
10 catiônico e, opcionalmente, um álcool graxo oleoso lipofílico. A emulsão do tipo óleo-em-água que é formada com a mistura da SEOF com uma solução aquosa tem gotas oleosas que são carregadas positivamente.

 Cook, R.O., et al. (6) descrevem um processo para a
15 geração de partículas de liberação sustentada para a aplicação de droga pulmonar. De acordo com este processo, nanopartículas de sulfato de terbutalina de droga isonizadas hidrofílicas são aprisionadas dentro de microesferas hidrofóbicas ao utilizar uma abordagem de secagem por
20 aspersão.

 Khoo, SM, et al. (7) descrevem formulações à base de lipídeos dispersas para a aplicação oral de drogas lipofílicas tais como Halofantrine. Um sistema de aplicação de droga auto-emulsificante lipídica (SED DS) e também um
25 sistema de aplicação de droga auto-microemulsificante (SMED DS) são descritos. Os sistemas compreendem um triglicerídeo, um mono/diglicerídeo, um tensoativo não-iônico, uma fase hidrofílica e a substância da droga. As formulações otimizadas consistiam em SEEDS e SMED DS de
30 triglicerídeo de cadeia média (MCT), e SMED DS de triglicerídeo de cadeia longa (LCT).

 Holm, R, et al. (1) descrevem um SMED DS que contém triglicerídeos com combinações diferentes dos ácidos graxos

de cadeia média e de cadeia longa, onde os ácidos graxos diferentes na cadeia principal do glicerol exibem elementos metabólicos diferentes.

Christensen, K.L., et al. (9) descrevem a
5 preparação de emulsões secas estáveis que podem reformar a emulsão do tipo óleo-em-água original por meio da reconstituição na água. As emulsões secas continham um polímero solúvel em água tal como a hidróxi propil metil
10 celulose (HPMC), a metil celulose ou a povidona, como veículo sólido, e óleo de coco fracionado. As emulsões do tipo óleo-em-água líquidas foram secadas por aspersão em uma secadora de aspersão de laboratório. O tamanho das gotas da emulsão reconstituída era de aproximadamente 1 μ m. Tacrolimus (Prograf®) é um agente imunossupressor de macrolide (MW de
15 804) que é derivado do fungo *Streptomyces tsukubaensis*, e foi demonstrado que ele é eficaz na profilaxia da rejeição a enxerto e no controle da rejeição a transplante aguda e resistente a esteróides ou ciclosporina. O tacrolimus é considerado como uma alternativa à imunossupressão da
20 ciclosporina e foi demonstrado que ele é 10-100 vezes mais potente do que a ciclosporina. O tacrolimus foi aprovado pelo FDA para a prevenção da rejeição a transplante do fígado em abril de 1994.

Tal como a ciclosporina, os parâmetros
25 farmacocinéticos do tacrolimus mostram uma elevada variabilidade inter- e intra-individual e ambas as drogas têm um índice estreito de elementos terapêuticos, necessitando do monitoramento da droga de elementos terapêuticos de sangue integral para otimizar o tratamento. A absorção e a
30 biodisponibilidade oral (10 - 25%) do tacrolimus são pobres, com taxa reduzida e extensão de absorção na presença de alimento. O tacrolimus é absorvido rapidamente, embora ainda

de maneira incompleta, no trato gastrointestinal. A concentração de pico de Tacrolimus (C_{max}) de sangue integral é alcançada aproximadamente uma a duas horas após a administração oral. Devido à baixa solubilidade aquosa, a
5 distribuição de tecido do tacrolimus depois da terapia oral ou parenteral é extensiva (10). O tacrolimus é principalmente restringido à glicoproteína de albumina e alfa1-ácido. Os eritrócitos ligam 75-80% da droga, resultando em concentrações de sangue integral que são dez a trinta vezes
10 maiores do que as concentrações do plasma (10). O tacrolimus é metabolizado quase que completamente antes da eliminação. O metabolismo é através das isoenzimas P450 (CYP)3A4 de citocromo no fígado e, até uma menor extensão, das isoenzimas CYP3A4 e P-glicoproteína na mucosa intestinal. A meia vida de
15 eliminação do tacrolimus em pacientes de transplante de fígado é de aproximadamente doze horas. Menos de 1% da dose é excretado inalterado na urina. O efluxo de P-glicoproteína de tacrolimus das células intestinais de volta ao lúmen do intestino permite o metabolismo de CYP3A4 antes da absorção,
20 desse modo limitando a disponibilidade do tacrolimus (11). Quando o tacrolimus é administrado com inibidores de CYP3A4 e P-glicoproteína (por exemplo, diltiazem, eritromicina, ou cetoconazol), um aumento da biodisponibilidade oral é observado. Há uma necessidade quanto a um aumento da
25 biodisponibilidade oral do tacrolimus pela aplicação de droga.

Uno, T, et al. (12) descrevem uma emulsão do tipo óleo-em-água (o/w) da droga tacrolimus à base de ácido oléico. Os diâmetros médios das gotas da emulsão do tipo
30 óleo-em-água eram de 0.47 μm . A formulação apresentada exibia biodisponibilidade, vantagens farmacocinéticas e utilidade potencial da emulsão como um veículo para a rota enteral do

tacrolimus em comparação à formulação comercializada padrão.

A patente norte-americana 6.884.433 (13) descreve uma formulação de liberação sustentada que contém tacrolimus assim como outros compostos de macrolide. A formulação de liberação sustentada ali apresentada compreende uma dispersão sólida de tacrolimus ou de seus hidratos, em uma mistura que compreende um polímero solúvel em água (tal como a hidróxi propil metil celulose) e um polímero insolúvel em água (tal como a etil celulose) e um excipiente (tal como a lactose). Na dispersão, o tamanho de partícula é igual ou menor do que 250 μm .

A fim de superar o metabolismo de primeira passagem e desse modo a baixa biodisponibilidade oral de elementos linfáticos intestinais, o transporte de drogas pode ser, portanto, explorado. Tal como acima mencionado, os compostos altamente lipofílicos alcançam a circulação sistêmica através dos elementos linfáticos. Foi verificado que a maior parte dos ácidos graxos, com comprimentos de cadeia iguais ou maiores do que 14, é recuperada na linfa torácica (14).

Além disso, o tamanho é uma das determinantes mais importantes da absorção linfática. Foi verificado que o tamanho ideal para a absorção linfática fica compreendido entre 10 e 100 nm (15). No entanto, a absorção é mais seletiva e mais lenta porque o tamanho das partículas aumenta. As partículas maiores podem ser retidas por períodos mais longos nos emplastros de Peyer, ao passo que as partículas menores são transportadas para o duto torácico (16). A administração oral de nano- e micropartículas poliméricas que são absorvidas pelo sistema linfático através de células M de emplastros de Peyer do intestino foi evidenciada e comprovada na literatura (17). As nanopartículas revestidas com polímeros hidrofóbicos tendem a ser capturadas facilmente por células linfáticas no corpo

(18).

Um outro método para a encapsulação das drogas em micropartículas foi descrito por Bassett et al. (19). O método envolve a inversão da fase ao dissolver a droga e um primeiro polímero em um solvente e ao adicionar à mistura formada dessa maneira um segundo polímero dissolvido em um "não-solvente" que conduz à formação espontânea de micro ou nanopartículas revestidas com polímero.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Um objetivo da presente invenção consiste na apresentação de um sistema para a aplicação de vários agentes ativos que são de caráter não-hidrofílico dentro de um corpo vivo.

Desse modo, em um aspecto da invenção, são providas microesferas que compreendem uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero formador de gel, em que as nanocápsulas compreendem um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-hidrofílico e um envoltório de revestimento polimérico.

A invenção também apresenta um método de preparação de microesferas que compreendem uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero formador de gel, em que as nanocápsulas compreendem um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-hidrofílico e um envoltório de revestimento polimérico, e método compreende:

(a) a provisão de uma fase orgânica que compreende óleo, um solvente orgânico miscível em água, um agente ativo não-hidrofílico dissolvido no solvente e um polímero ou uma combinação de polímeros para revestir o dito núcleo de óleo;

(b) a adição lenta de água à dita fase orgânica para obter uma emulsão;

(c) a adição contínua de água à emulsão para induzir a inversão da fase da dita emulsão, obtendo desse

modo uma emulsão do tipo óleo-em-água (o/w);

(d) a mistura da dita emulsão do tipo óleo-em-água com um polímero formador de gel ou uma combinação de polímeros formadores de gel;

5 (e) a remoção do dito solvente orgânico e da água para obter as ditas microesferas.

A invenção também apresenta composições farmacêuticas que compreendem como componente ativo microesferas que compreendem uma pluralidade de nanocápsulas
10 acomodadas em um polímero formador de gel, em que as nanocápsulas compreendem um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-hidrofílico e um envoltório de revestimento polimérico.

Além disso, a invenção apresenta um método para
15 aumentar a biodisponibilidade de um agente ativo no corpo de um indivíduo humano, sendo que o método compreende a administração ao dito indivíduo de microesferas que compreendem uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero formador de gel, em que as nanocápsulas compreendem
20 um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-hidrofílico e um envoltório de revestimento polimérico.

Adicionalmente, a invenção apresenta um método de tratamento de um indivíduo para uma condição patológica que requer para o dito tratamento uma quantidade eficaz de um
25 agente ativo com o sangue do indivíduo, sendo que o método compreende a administração ao dito indivíduo de microesferas que compreendem uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero formador de gel, em que as nanocápsulas compreendem um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-
30 hidrofílico e um envoltório de revestimento polimérico.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A fim de compreender a invenção e ver como ela pode ser executada na prática, uma realização preferida será

descrita agora, apenas a título de exemplo não-limitador, com referência aos desenhos em anexo, nos quais:

5 As Figuras 1A-1B são micrografias TEM da formulação de nanocápsulas número 29 antes de adicionar a solução de hidróxi propil metil celulose. A relação de volume entre a solução acetônica e a solução de água é de 100:75. A barra representa 100 nm em tamanho. A Figura 1B é uma ampliação da Figura 1A.

10 Figuras 2A-2B são micrografias TEM da formulação de nanocápsulas número 29 com solução de hidróxi propil metil celulose. A relação de volume entre a solução acetônica e a solução de água é de 100:275. A barra representa 1.000 nm na (Figura 2A) e 100 nm na (Figura 2B).

15 As Figuras 3A-3B são micrografias TEM da formulação de nanocápsulas número 30 sem solução de hidróxi propil metil celulose. A relação de volume entre a solução acetônica e a solução de água é de 100:75. A barra representa 1.000 nm, onde a Figura 3B é uma ampliação da Figura 3A.

20 A Figura 4 mostra a distribuição de tamanho de partícula antes da secagem por aspersão da formulação número 29.

25 As Figuras 5A-5B são micrografias SEM da formulação de nanocápsulas número 29 antes de adicionar a solução de hidróxi propil metil celulose (a barra representa 10,0 μm na Figura 5A; 2,0 μm na Figura 5B).

As Figuras 6A-6B são micrografias SEM da formulação de nanocápsulas número 29 com a solução de hidróxi propil metil celulose depois da secagem por aspersão (a barra representa 20,0 μm na Figura 6A; 10,0 μm na Figura 6B).

30 Figuras 7A-7B são micrografias SEM da formulação de nanocápsulas número 29 depois de adicionar a solução de hidróxi propil metil celulose e após uma dissolução de três

horas (a barra representa 20,0 μm na Figura 7A; 10,0 μm na Figura 7B).

As Figuras 8A-8D são micrografias SEM da formulação de nanocápsulas número 30 depois de adicionar a solução de hidróxi propil metil celulose e após a secagem por aspersão (a barra representa 50,0 μm na Figura 8A; 20,0 μm na Figura 8B; 10 μm na Figura 8C; 5,0 μm na Figura 8D).

As Figuras 9A-9B são micrografias SEM da formulação de nanocápsulas número 30 depois de adicionar a solução de hidróxi propil metil celulose e após a secagem por aspersão e uma dissolução de três horas (a barra representa 10,0 μm na Figura 9A; 5,0 μm na Figura 9B).

A Figura 10 é um gráfico que mostra os perfis da liberação de DXPL de microesferas de metil celulose que compreendem nanocápsulas com os revestimentos diferentes de mistura de Eudragit.

A Figura 11 é um gráfico que mostra os perfis da liberação de DXPL de nanocápsulas de Eudragit carregadas com DXPL microencapsuladas e de óleo carregado com DXPL microencapsulado em emulsão de água.

A Figura 12 é um gráfico que mostra a concentração de tacrolimus no sangue sistêmico depois da administração P.O. de formulações diferentes a ratos (média $\pm$ SD, n = 6).

A Figura 13 é um gráfico que mostra a concentração de tacrolimus no sangue sistêmico depois da administração P.O. de formulações diferentes a ratos (média $\pm$ SD, n = 6).

A Figura 14 é um gráfico que mostra níveis de tacrolimus no sangue depois da absorção oral de doses de tacrolimus de 0,7 mg/kg em várias formulações (o tacrolimus formulado como uma suspensão do produto comercial em cápsula Prograf® (Prod. Com.), uma emulsão (Emuls.), uma emulsão embutida nas microesferas sem Eudragit mas com hidróxi propil metil celulose (Emuls. Seca), sem hidróxi propil metil

celulose mas com nanocápsulas de Eudragit e lactose como um agente de secagem por aspersão (Sem Metocel)).

5 A Figura 15 é um gráfico que mostra a concentração de tacrolimus no sangue sistêmico depois da administração P.O. de duas bateladas idênticas da formulação 29 a ratos (média $\pm$ SD, $n = 6$ para a Batelada I e $n = 3$ para a Batelada II), avaliação da reproducibilidade de batelada.

10 A Figura 16 é um gráfico que mostra os níveis de tacrolimus no sangue depois da administração intravenosa de um concentrado comercial de Prograf® para a ampola de infusão a uma dose de 160 μ g/kg a ratos (média $\pm$ SD, $n = 5$).

15 A Figura 17 é um gráfico que mostra níveis de tacrolimus no sangue depois da absorção oral de doses de tacrolimus de 0,7 mg/kg em várias formulações a ratos (média $\pm$ SD, $n = 3-6$, $p > 0,05$).

A Figura 18 é um micrografo fluorescente de seção histológica do duodenum de rato trinta minutos após a gavagem oral da formulação número 29, carregada com cumarina-6 como um marcador.

20 As Figuras 19A-19D são fotomicrografias de nanocápsulas vazias secas (Figura 19A) ou impregnadas (Figuras 19B-19D) preparadas com o revestimento de nanocápsula de Eudragit L:RS (75:25) e revestimento de matriz de hidróxi propil metil celulose.

25 A Figura 20 é um gráfico que mostra os níveis de tacrolimus no sangue depois da administração oral a miniporcos de doses de 1 mg de tacrolimus em uma formulação comercial (Prograf) ou na formulação número 29 (média $\pm$ SD, $n = 4$).

30 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada na descoberta que a formação de microesferas que compreendem uma pluralidade de minúsculas gotas de óleo revestidas por uma mistura de

polímero, em que a pluralidade de gotas de óleo revestidas com polímero ainda é acomodada em um polímero formador de gel, aumentou significativamente os níveis no sangue de drogas lipofílicas dissolvidas no núcleo de óleo. Estas
5 "gotas de óleo revestidas duplas" conduziram à compreensão que as microesferas que acomodam uma pluralidade de nanocápsulas podem servir como um veículo de aplicação para vários agentes ativos que são de natureza não-hidrofílica.

Desse modo, de acordo com uma realização, são
10 providas microesferas que compreendem uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero formador de gel, em que as nanocápsulas compreendem um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-hidrofílico e um envoltório de revestimento polimérico.

15 O termo "microesferas", que pode ser empregado intercambiavelmente com os termos "micropartículas", define amplamente as partículas na escala de micra ou submicra que são compostas tipicamente de materiais sólidos ou semi-sólidos e podem conter e liberar uma droga ou qualquer outra
20 nanocápsula contendo agente ativo encerrada nas mesmas. As microesferas de acordo com a invenção são mais ou menos de uma estrutura esférica que compreende agregados de nanocápsulas que incorporam (por exemplo, encerram, encapsulam, aprisionam) o agente ativo. Tipicamente, o
25 diâmetro médio das microesferas da invenção, que é compreendido como o diâmetro médio ponderal tal como determinado pela difração a laser, varia de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 500 μm . Mais preferivelmente, o diâmetro médio das microesferas fica compreendido entre
30 aproximadamente 10 μm e aproximadamente 20 μm .

O termo "nanocápsulas", tal como aqui empregado, denota estruturas na escala de nano ou subnano que compreendem uma gota de óleo (gotas finas de óleo) revestida

com um revestimento polimérico formado. O revestimento polimérico forma um envoltório duro que envolve o núcleo de óleo. As nanocápsulas têm um diâmetro médio entre aproximadamente 100 nm e aproximadamente 1.000 nm, 5 preferivelmente entre aproximadamente 100 nm a 900 nm, e mais preferivelmente entre aproximadamente 100-300 nm e aproximadamente 300-500 nm. Além disso, o tamanho das nanocápsulas em um microesfera é essencialmente uniforme com aproximadamente 99% das gotas de óleo com um diâmetro abaixo 10 de 1 micron. Conforme aqui empregado, a expressão "nanocápsulas" deve ser compreendido como um sinônimo para todas as gotas de óleo com revestimento polimérico ou a gotas de óleo que têm um revestimento polimérico.

O termo "pluralidade de nanocápsulas", conforme 15 aqui empregado, denota duas ou mais de tais nanocápsulas acomodadas no polímero formador de gel.

O agente ativo é encerrado dentro da nanocápsula. Em consequência disto, não há nenhum contato direto entre o agente ativo e o polímero formador de gel que formam as 20 microesferas. De fato, com o umedecimento e o intumescimento, as microesferas liberam no trato gastrointestinal a nanocápsula apenas e não o agente ativo "nu", o que equivale dizer, uma forma particulada do próprio agente ativo (por exemplo, droga) ou o agente em seu nível molecular.

25 Conforme aqui empregado, a expressão "agente ativo não-hidrofílico" denota o composto que é considerado, pelo menos até alguma extensão, como repelente de água. Em outras palavras, qualquer agente que exibe uma capacidade hidrofóbica ou hidrofílica baixa, média ou alta deve ser 30 considerado como um agente não-hidrofílico. Um agente não-hidrofílico pode ser definido pelos parâmetros que caracterizam o coeficiente de divisão/distribuição do agente (como um soluto) entre duas fases, por exemplo, um solvente

orgânico e água (o sistema mais comumente utilizado é octanol-água). Tipicamente, um coeficiente de divisão ($\log P$) descreve a capacidade hidrofóbica de compostos neutros, ao passo que o coeficiente de distribuição ($\log D$, que é uma
5 combinação de pK_a e $\log P$) é uma medida da capacidade hidrofóbica dependente do pH do agente. Um agente ativo não-hidrofílico de acordo com a invenção é qualquer composto que tem um $\log P > 1,5$.

O núcleo de óleo das nanocápsulas pode compreender
10 um único tipo de óleo ou uma combinação de óleos e pode ser selecionado de uma ampla gama de óleos normalmente utilizáveis, de óleos polares a óleos não-polares, contanto que eles não se misturem com a fase de água e sejam um líquido como um todo. De acordo com uma realização, as gotas
15 de óleo compreendem um óleo selecionado entre óleos vegetais de cadeia longa, óleos de ésteres, álcoois líquidos superiores, ácidos graxos líquidos superiores, gorduras e óleos naturais, e óleos de silicone. De acordo com uma realização preferida, o núcleo de óleo compreende um óleo
20 natural tal como o óleo de milho, o óleo de amendoim, o óleo de coco, o óleo de rícino, o óleo de gergelim, o óleo de soja, o óleo de perila, o óleo de girasol, o óleo de argan e o óleo de nozes.

Cada uma das gotas de óleo é encerrada dentro de um
25 revestimento polimérico para formar nanocápsulas que compreendem o núcleo de óleo e um envoltório polimérico que circunda o núcleo de óleo. O revestimento polimérico forma uma estrutura de envoltório que circunda o núcleo de óleo.

O termo "envoltório" no contexto da presente
30 invenção denota qualquer estrutura polimérica sólida ou semisólida que inclui uma gota de óleo. O envoltório pode compreender um único polímero ou uma combinação ou uma mistura de dois ou mais polímeros tal como será discutido

mais adiante. Quando o revestimento polimérico compreende uma mistura de polímeros, é preferível que pelo menos um dos polímeros seja solúvel a um pH acima de 5,0, ou que pelo menos um dos polímeros seja solúvel em água (independente do pH).

De acordo com uma realização, a combinação de pelo menos dois polímeros compreende uma mistura de polímeros que compreende um primeiro polímero ou polímeros (grupo de polímeros) que é solúvel em água (independente do pH) ou solúvel a um pH acima de 5,0 e um segundo polímero ou polímeros (segundo grupo de polímeros) que é um polímero insolúvel em água.

A expressão "polímero solúvel em água" denota qualquer polímero que, quando introduzido em uma fase aquosa a 25°C, a uma concentração de massa igual a 1%, torna possível a obtenção de uma solução macroscopicamente homogênea e transparente, isto é, uma solução que tem um valor de transmissão de luz mínimo, a um comprimento de onda igual a 500 nm, através de uma amostra de 0,1 cm de espessura, de pelo menos 80% e preferivelmente de pelo menos 90%.

A expressão "polímero solúvel a um pH acima de 5,0" denota qualquer polímero que, a um pH abaixo de 5,0 e a 25°C, não perde mais de 10% de seu peso seco no meio pela dissolução, ao passo que na mesma temperatura, em um meio aquoso que tem um pH acima de 5,0, ele forma um hidrogel ou é dissolvido para formar uma solução macroscopicamente homogênea e transparente. Tais polímeros são indicados algumas vezes pela expressão "polímeros entéricos".

Muitos polímeros solúveis em água são conhecidos no estado da técnica. Os polímeros apropriados no contexto da presente invenção compreendem e incluem, mas não ficam a eles limitados, polióis e polícarboidratos. Os polímeros solúveis

em água exemplificadores incluem celulosas hidroxiladas tais como, por exemplo, hidróxi propil metil celulose e hidróxi metil celulose. Outros polímeros solúveis em água apropriados incluem o polietileno glicol. As combinações de dois ou mais
5 polímeros solúveis em água também são contempladas.

Além disso, muitos polímeros que são solúveis somente a um pH acima de 5,0 são conhecidos no estado da técnica. Os exemplos não-limitadores de polímeros entéricos aplicáveis com respeito à invenção incluem: ftalato de
10 hidróxi propil metil celulose (HP55), ftalato de acetato de celulose, ftalato de carbóxi metil celulose, e qualquer outro derivado de ftalato de celulose, shellac, Eudragit L100-55, zeína.

Um polímero entérico preferido é Eudragit L100-55.

15 A expressão "polímero insolúvel em água" denota qualquer polímero que não perde mais de 10% de seu peso seco em um meio aquoso pela dissolução, independentemente do pH do meio. Os exemplos não-limitadores de polímeros insolúveis em água incluem ésteres de celulose tais como di- e triacilatos
20 incluindo ésteres mistos tais como, por exemplo, acetato de celulose, diacetato de celulose, triacetato de celulose, propionato de celulose, butirato de acetato de celulose, propionato de acetato de celulose, tripropionato de celulose; éteres de celulose tais como etil celulose; náilons;
25 policarbonatos; poli(dialquilsiloxanos); poli(ésteres de ácido metacrílico); poli(ésteres de ácido acrílico); poli(óxidos de fenileno); poli(álcoois de vinila); polímeros aromáticos contendo nitrogênio; epóxidos poliméricos; celulose regenerada; materiais formadores de membrana
30 apropriados para o uso na aplicação de osmose reversa ou diálise; acetato de ágar; triacetato de amilose; acetato de beta glucano; acetaldeido acetato de dimetila; carbamato de metila - acetato de celulose; succinato de acetato de

celulose; acetato de dimetilamino - acetato de celulose; carbonato de etila - acetato de celulose; cloroacetato de acetato de celulose; oxalato de etila - acetato de celulose; propionato de acetato de celulose; copolímeros de poli(éter
5 vinilmetílico); sulfonato de butila - acetato de celulose; octato de acetato de celulose; laurato de acetato de celulose; sulfonato de p-tolueno - acetato de celulose; triacetato de goma de alfarroba; etileno hidroxilado-acetato de vinila; butirato de acetato de celulose; cera ou
10 substâncias do tipo cera; álcoois graxos; óleos vegetais hidrogenados; poliésteres, homo e copolímeros, tal como o ácido poliláctico ou PLAGA e outros ainda, e as combinações destes.

Os polímeros insolúveis em água preferidos de
15 acordo com a invenção são Eudrgit RS ou Eudragit RL, ou uma combinação dos mesmos.

Quando as nanocápsulas compreendem pelo menos dois polímeros, o primeiro polímero é um polímero insolúvel em água e o segundo polímero é solúvel a um pH acima de
20 aproximadamente 5,0.

De acordo com uma realização preferida, a relação de peso/peso entre o(s) primeiro(s) polímero(s), isto é, o polímero ou grupo de polímeros insolúveis em água e o polímero ou segundo grupo de polímeros, isto é, o(s)
25 polímero(s) a um pH acima de aproximadamente 5,0 ou grupo de tais polímeros, fica compreendida preferivelmente na faixa entre 5:95 e 50:50.

Sem ficar limitado pela teoria, acredita-se que a relação entre o polímero insolúvel em água e o polímero
30 solúvel a um pH acima de aproximadamente 5,0 (o polímero "não-insolúvel") é crítica para controlar a liberação do agente ativo das nanocápsulas. A provisão de um primeiro polímero que seja insolúvel em água e um segundo polímero que

seja solúvel em água ou solúvel em água a um pH acima de 5,0, depois da exposição das nanocápsulas à água ou a um meio aquoso que tem pH acima de 5,0, permite a dissolução lenta do polímero, enquanto o arranjo geral do polímero insolúvel é essencialmente mantido. Em outras palavras, a dissolução lenta do polímero "não-insolúvel" resulta na formação de passagens parecidas com canais no "esqueleto" de um polímero formado a partir do polímero insolúvel em água, através do qual o agente ativo pode escapar da nanocápsula. A fim de facilitar a liberação do controle do agente ativo das nanocápsulas, foi previsto que uma relação preferida entre o primeiro polímero, isto é, o polímero insolúvel em água, e o chamado polímero "não-insolúvel" é que é a favor do polímero solúvel a um pH acima de aproximadamente 5,0 (por exemplo, uma relação de peso:peso de 75:25 a favor do polímero não-insolúvel em água).

De acordo com uma realização, a combinação polimérica compreende uma mistura de um primeiro polímero ou grupo de polímeros (o polímero insolúvel) selecionados entre Eudragit RL ou Eudragit RS ou uma combinação dos mesmos, e um segundo polímero ou grupo de polímeros (o polímero solúvel em água ou solúvel a um pH acima de 5,0) selecionados entre Eudragit L100-55 e ftalato de hidróxi propil metil celulose (HPMPC) ou uma combinação dos mesmos. Uma seleção específica da combinação de polímeros de acordo com a invenção compreende Eudragit RS e Eudragit L100-55 a uma relação de peso/peso de aproximadamente 25:75 a aproximadamente 50:50.

A pluralidade de nanocápsulas é acomodada dentro de um polímero formador de gel.

Conforme aqui empregado, a expressão "polímero formador de gel" denota qualquer polímero hidrofílico que, quando umedecido, forma uma rede de polímeros que intumescce ou forma géis. O polímero formador de gel também é indicado,

algumas vezes, como polímero formador de hídregel. O polímero formador de gel pode ser uma proteína natural ou um polímero sintético. De acordo com uma realização preferida da invenção, o polímero formador do gel é aquele que, quando
5 umedecido, fica "pegajoso", isto é, com a capacidade de intensificar a aderência de microesferas e nanocápsulas umedecidas nele contidas ao epitélio intestinal.

Conforme aqui empregado, a expressão "acomodadas" denota incluir, revestir, encerrar, circundar, confinar,
10 aprisionar ou qualquer outra maneira de incorporar as nanocápsulas pelo(s) polímero(s) formador(es) de gel de modo a obter um arranjo acondicionado de uma pluralidade de nanocápsulas que compreendem o agente ativo com um segundo elemento de proteção.

15 Os exemplos não-limitadores de polímeros formadores de gel naturais incluem proteínas, tais como gelatina ou colágeno, e polissacarídeos tais como ágar, carragenina, glucomanana, escleroglucano, esquizofilano, goma de gelana, ácido algínico, curdlano, pectina, ácido hialurônico, ou goma
20 de guar.

Os exemplos não-limitadores de polímeros formadores de gel sintéticos incluem o ácido poliacrílico, celulose modificada, metil celulose, metil propil celulose, carbóxi metil celulose, celulose cationizada; hidróxi propil metil
25 celulose, hidróxi etil celulose, polímero de carbóxi vinila, polivinil pirrolidona, acetato de polivinilacetaldietilamino, álcool polivinílico, carbóxi metil celulose sódica, 2-metil-5-vinil piridina, carbômeros, e outros ainda.

Um aspecto da invenção refere-se ao uso das
30 microesferas como um sistema da aplicação do agente ativo através do trato gastrointestinal, isto é, para a administração oral. Uma realização preferida de acordo com este aspecto da invenção refere-se à aplicação de agentes

ativos que são substratos da bomba de efluxo de P-gp.

Alternativamente, as microesferas podem ser projetadas para a administração por injeção.

A expressão "substrato de bomba de efluxo de P-gp",
5 que pode ser empregada intercambivelmente com a expressão
"substrato de P-gp", tal como aqui empregado, denota qualquer
substância ativa (para finalidades terapêuticas, cosméticas
ou de diagnóstico) que é sujeita ao transporte ativo, "eflui"
para fora das células através do transportador ligado a
10 membrana de P-gp. A P-gp é expressa ao longo de todo o
comprimento do intestino e também no fígado, nos rins, na
barreira sangue-cérebro e na placenta. Neste contexto, a
presente invenção refere-se a substâncias medicinais
sujeitadas ao transporte ativo pela P-gp intestinal que fica
15 localizada nas membranas apicais das células epiteliais.
Utilizando a energia que é gerada pela hidrólise de ATP, a P-
gp dirige o efluxo de vários substratos contra um gradiente
de concentração e reduz desse modo a sua concentração
intracelular e, no caso de substâncias ativas, a sua
20 biodisponibilidade oral.

Desse modo, de acordo com uma realização preferida
da presente invenção, o agente ativo é qualquer substância
medicinal, cosmética ou de diagnóstico que, depois da
administração oral, a sua biodisponibilidade no sangue é
25 diminuída ou inibida em consequência do mecanismo de efluxo
de P-gp. Os substratos de P-gp podem ser classificados de
acordo com a sua solubilidade e nível de metabolismo. Uma
lista não-limitadora de substratos do P-gp de acordo com esta
classificação inclui:

30 alta solubilidade e metabolismo extensivo:
amitriptilina, cochicina, dexametasona, diltiazem, etinil
estradiol;

baixa solubilidade e metabolismo extensivo:

atorvastatina, azitromicina, carbamazepina, ciclosporina, gliburide, haloperidol, itraconazol, tacrolimus sirolimus, ritonavir, sanquinavir, lovastatina;

alta solubilidade e metabolismo pobre: amiloide, amoxicilina, cloroquina, ciprofloxacina, dicloxacilina, eritromicina, fexofenadina, levodopa, midazolaina, morfina, nifedipina, primaquina, promazina, prometazina, quinidina, quinino; e

baixa solubilidade e metabolismo pobre: ciprofloxacina e talinolol.

No contexto da presente invenção, o agente ativo não-hidrofílico é um composto lipofílico ou anfipático ou complexos ou misturas que contêm tais compostos. O agente ativo não-hidrofílico também inclui os compostos hidrofílicos que foram modificados, por exemplo, pela fixação de uma porção lipofílica, para aumentar a capacidade lipofílica do agente. Estes compostos modificados são aqui indicados, algumas vezes, pelo termo "pró-droga".

O agente ativo pode estar na forma de ácido livre, de base livre ou de sal, e misturas de agentes ativos podem ser empregadas.

De acordo com uma realização, o agente ativo é um agente lipofílico.

A expressão "agente lipofílico" é aqui empregada para denotar o composto que tem um log P (octanol/água) > 2,0-3,0 e uma solubilidade de triglicerídeo (TG), tal como medido, por exemplo, pela solubilidade no óleo de soja ou similar, acima de 10 mg/ml. Esta definição inclui as drogas de meio lipofílico, isto é, aquelas que têm um logP entre 3,0 e 6, bem como as drogas altamente lipofílicas, que têm um logP > 6.

Os exemplos do meio para agentes ativos lipofílicos terapeuticamente ativos que podem ser apropriados para o

aprisionamento nas nanocápsulas de acordo com a presente invenção incluem os seguintes:

Analgésicos e agentes anti-inflamatórios:
aloxiprin, auranofin, azapropazone, benorilate, diflunisal,
5 etodolac, fenbufen, fenoprofen, calcim, flurbiprofen,
ibuprofen, indometacin, ketoprofen, ácido meclofenâmico,
ácido mefenâmico, nabumetone, naproxen, oxifenbutazona,
fenilbutazona, piroxicain, sulindac.

Anti-helmínticos: albendazol, hidróxi naftoato de
10 befênio, cambendazol, diclorofen, ivenectina, mebendazol,
oxamniquina, oxfendazol, embonato de oxantel, praziquantel,
embonato de pirantel, tiabendazol.

Agentes anti-arrítmicos: amiodarone, disopiramida,
acetato de flecainida, sulfato de quinidina.

15 Agentes anti-bacterianos: benetamina, penicilina,
cinoxacina, ciprofloxacina, claritromicina, clofazimina,
cloxacilina, demeclociclina, doxiciclina, eritromicina,
etionamida, imipenem, ácido nalidíxico, nitrofurantoina,
rifampicina, espiramicina, sulfabenzamida, sulfadoxina,
20 sulfamerazina, sulfacetamida, sulfadiazine, sulfafurazol,
sulfametoxazol, sulfapiridina, tetraciclina, trimetoprim.

Anti-coagulantes: dicoumarol, dipiridamol,
nicoumalona, fenindiona.

Antidepressivos: amoxapine, maprotiline, mianserin,
25 nortriptiline, trazodona, maleato de triinipramine.

Anti-diabéticos: acetohexamida, clorpropamida,
glibenclamida, gliclazida, glipizida, tolazamida,
tolbutamida.

Anti-epilépticos: beclamida, carbamazepina,
30 clonazepam, etotoina, metoina, metsuximida,
metilfenobarbitona, oxcarbazepina, parametadiona,
fenacernida, fenobarbitona, feniloina, fensuximida,
primidona, sultiame, ácido valpróico.

Agentes anti-fúngicos: anfotericina, nitrato de butoconazol, clotrimazol, nitrato de econazol, fluconazol, flucitosine, griseofulvin, itraconazol, cetoconazol, miconazol, natarnicina, nistatina, nitrato de sulconazol, 5 terbinafine, terconazol, tioconazol, ácido undecenóico.

Agentes aanti-gota: alopurinol, probenecid, sulfinpirazona.

Agentes anti-hipertensivos: amlodipine, benidipine, darodipine, dilitazem, diazoxide, felodipine, acetato de 10 guanabenz, isradipine, minoxidil, nicardipine, nifedipine, nirnodipine, fenoxibenzamina, prazosin, reserpina, terazosin.

Antimaláricos: arnodiaquina, cloroquina, clorproguanil, halofantrine, mefloquina, proguanil, pirimetamina, sulfato de quinino.

15 Agentes anti-enxaqueca: mesilato de diidroergotamina, tartrato de ergotamina, maleato de metisergide, maleato de pizotifeno, succinate de sumatriptano.

Agentes anti-muscarínicos: atropina, benzexol, 20 biperiden, etopropazine, hiosciarnine, brometo de mepenzolate, oxifencilcimine, tropicamide.

Agentes anti-neoplásticos e imunossupressores: aminoglutetimida, amsacrine, azatioprine, busulfan, clorambucil, ciclosporina, dacarbazine, estramustine, 25 etoposide, lomustine, melfalan, mercaptopurine, metotrexate, mitomicina, mitotane, mitozantrona, procarbazine, citrato de tamoxifeno, testolactona, tacrolimus, sirolimus.

Agentes antiprotozoários: benzidazol, clioquinol, decoquinolate, diiodo hidróxi quinolina, furoato de diloxanide, 30 dinitolmide, furzolidone, metronidazol, nimorazol, nitrofurazone, ornidazol, tinidazol.

Agentes anti-tireóide: carbimazol, propiltiouracil.

Alíxiolíticos, sedativos, hipnóticos e

neurolépticos: alprazolam, ainilobarbitone, barbitone,
 bentazepain, broinazepam, bromperidol, brotizolam,
 butobarbitone, carbromal, clordiazepoxide, clormetiazol,
 clorpromazine, clobazam, clotiazepam, clozapine, diazepam,
 5 droperidol, etinamate, flunanisone, flunitrazepar,
 fluopromazine, decanoato de flupentixol, decanoato de
 flufenazine, flurazepam, baloperidol, lorazepam,
 lormetazepam, medazepam, meprobamate, metaqualone, midazolam,
 nitrazepam, oxazepam, pentobarbitone, perfenazine pimozone,
 10 prochlorperazine, sulpiride, temazepam, tioridazine,
 triazolain, zopiclone.

Beta-bloqueadores: acebutolol, alprenolol,
 atenolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oxprenolol,
 pindolol, propranolol.

15 Agentes inotrópicos cardíacos: amrinone, digitoxin,
 digoxin, enoximone, lanatoside C, medigoxin.

Corticoesteróides: beclometasona, betametasona,
 budesonide, acetato de cortisona, desoximetasona,
 dexametasona, acetato de fludrocortisona, flunisolide,
 20 flucortolone, propionato de fluticasona, hidrocortisona,
 metilprednisolone, prednisolone, prednisone, triamcinolone.

Diuréticos: acetazolamida, amiloride,
 bendrofluazide, bumetanide, clorotiazide, clortalidona, ácido
 etacrínico, fruseinide, metolazona, espironolactona,
 25 triamterene.

Agentes anti-parkinsonianos: mesilato de
 bromocriptina, maleato de lisuride.

Agentes gastro-intestinais: bisacodil, cimetidine,
 cisapride, difenoxilate, doinperidone, famotidine,
 30 loperamide, mesalazine, nizatidine, omeprazol, ondansetron,
 ranitidine, sulfasalazine.

Antagonistas de Receptores de Histamina H:
 acrivastina, astemizol, cinnarizine, ciclizine,

ciproheptadine, dimenhidrinato, flunarizine, loratadine, meclozine, oxatomide, terfenadine.

Agentes reguladores de lipídeos: bezafibrate, clofibrate, fenofibrate, gemfibrozil, probucol.

5 Nitratos e outros agentes anti-angina: nitrato de amila, trinitrato de glicerila, dinitrato de isosorbide, mononitrato de isosorbide, tetranitrato de pentaeritritol.

Agentes nutritivos: betacaroteno, vitamina A, vitamina B sub. 2, vitamina D, vitamina E, vitamina K.

10 Inibidores de protease de HIV: Nelfinavir.

Analgésicos opióides: codeína, dextropropioxifeno, diamorfina, diidrocodeína, meptazinol, metadona, morfina, nalbufine, pentazocine.

Hormônios sexuais: citrato de clomifene, danazol, 15 etinil estradiol, acetato de medroxiprogesterona, mestranol, metiltestosterona, noretisterona, norgestrel, estradiol, estrogênios conjugados, progesterona, estanozolol, estibestrol, testosterona, tibolone.

Estimulantes: amfetamina, dexamfetamina, 20 dexfenfluramina, fenfluramina, mazindol.

Sem ficar a elas limitados, as drogas preferidas de acordo com a invenção incluem tacrolimus, sirolimus halofantrine, ritonavir, loprinavir, amprenavir, saquinavir, calcitrol, dronabinol, isotretinoin, tretinoin, base de 25 risperidona, ácido valpróico, ao passo que as pró-drogas preferidas incluem o palmitato de dexametasona, o palmitato de paclitaxel, o palmitato de docetaxel.

Alguns exemplos não-limitadores das drogas lipofílicas que podem ser incorporadas no sistema de 30 aplicação da presente invenção e de suas aplicações médicas são descritos por Robert G. Strickley [Strickley R.G. Pharmaceutical Research, 21(2):201-230;(2004)] e por Kopparar Manjunat, et al. [Manjunat K. et al., Journal of Controlled

Release 107:215-228; (2005)].

De acordo com uma outra realização, o agente ativo é um agente anfipático. A expressão "agente anfipático" é aqui empregada para denotar o composto que tem um valor de
5 log P entre 1,5 e 2,5 e uma solubilidade de triglicerídeo (TG), tal como medida, por exemplo, pela solubilidade em óleo da soja ou similar, acima de 10 mg/ml.

Os exemplos dos agentes ativos anfipáticos que podem ser aplicados pelo sistema da invenção incluem, sem
10 ficar a eles limitados, salicilato de pisostigmina, clorpromazine, flufenazine, trifluoperazine, e lidocaina, bupivacaina, anfotericina B, etoposide, teniposide e equinocandinas e azóis fungicidas, tais como clotrimazol e itaconazol.

Um outro exemplo de um agente ativo
15 terapeuticamente não-hidrofílico apropriado para ser aprisionado nas nanocápsulas de acordo com a invenção inclui, sem ficar a ela limitado, a clozapine. A clozapine é uma droga antipsicótica atípica eficaz aplicada no tratamento da
20 esquizofrenia resistente. A clozapine é rapidamente absorvida oralmente com uma biodisponibilidade de 27%. A clozapine é metabolizada extensivamente pelas enzimas microsossomais hepáticas (CYP1A2 e CYP3A4) e forma metabólitos de N-demetila e N-óxido. Desse modo, a clozapina é um bom candidato para a
25 aplicação pelo sistema da presente invenção.

A invenção também apresenta um método de preparação das microesferas que acomodam uma pluralidade de nanocápsulas de acordo com a presente invenção, sendo que o método compreende:

30 (a) a provisão de uma fase orgânica que compreende óleo, um solvente orgânico miscível em água, um agente ativo não-hidrofílico dissolvido no solvente e um polímero ou combinações de polímeros para revestir o núcleo de óleo;

(b) a acição lenta de água à dita fase orgânica para obter uma emulsão do tipo água-em-óleo;

(c) a adição contínua, preferivelmente por gotejamento, de água à emulsão do tipo água-em-óleo para
5 induzir a inversão da fase da emulsão, obtendo desse modo uma emulsão do tipo óleo-em-água (o/w);

(d) a misturação da emulsão do tipo óleo-em-água com um polímero formador de gel ou uma combinação de polímeros formadores de gel;

10 (e) a remoção do solvente orgânico e da água para obter microesferas que acomodam uma pluralidade de nanocápsulas. É essencial observar que as nanocápsulas compreendem um núcleo de óleo em que o agente ativo é dissolvido ou disperso e que este núcleo de óleo é encerrado
15 por um envoltório polimérico. A pluralidade de núcleos revestidos de envoltório de óleo é acomodada no polímero formador de gel, de uma maneira tal que não há nenhum contato direto entre o agente e o polímero formador de gel.

O solvente orgânico utilizado no método da invenção
20 pode ser qualquer solvente orgânico miscível com água que tenha um ponto de ebulição próximo ou abaixo do ponto de ebulição da água. Uma lista não-limitadora de tais solventes orgânicos inclui o etanol, o metanol, a acetona, o acetato de etila, o isopropanol (ponto de ebulição de 108°C, embora
25 seja, considerado como volátil no contexto da presente invenção).

O uso de uma combinação de óleo e do solvente orgânico permite a encapsulação dentro das nanocápsulas de vários agentes que são essencialmente de natureza não-
30 hidrofílica. O núcleo de óleo também pode incluir um ou mais excipientes não-hidrofílicos (por exemplo, excipientes lipofílicos). Para esta finalidade, o método da invenção também pode incluir a adição de um ou mais excipientes na

fase orgânica. O excipiente é preferivelmente qualquer excipiente que tenha uma solubilidade de pelo menos 1% em uma fase de óleo. De acordo com um exemplo, o excipiente é um tensoativo lipofílico, tal como labrafil M CS 1944, 5 polisorbate 80, e polisorbate 20.

À fase orgânica que contém óleo, a água é adicionada lentamente, essencialmente por gotejamento. No começo, uma emulsão do tipo óleo-em-água é formada, isto é, gotas de água são dispersas na fase orgânica. No entanto, a 10 adição lenta contínua de água ao meio resulta eventualmente em um fenômeno inverso, onde contínua e não-contínua são 'alternadas' de maneira tal que as gotas de óleo revestidas com o revestimento de polímero são dispersas na água.

O termo "emulsão" aqui empregado denota um sistema 15 que tem pelo menos duas fases líquidas, uma das quais é dispersa na outra. A fase dispersa também é indicada como fase interna, fase descontínua, fase incoerente (as gotas dispersas), ao passo que a fase externa também pode ser indicada como fase coerente ou contínua. As emulsões podem 20 compreender mais de duas fases. Por exemplo, elas podem compreender três fases líquidas (isto é, emulsões triplas), ou duas fases líquidas e uma fase contínua. A todas as emulsões, o ponto comum é que a sua fase externa se encontra em um estado líquido. Se uma terceira fase estiver presente, 25 como uma fase líquida ou contínua, esta é geralmente dispersa na fase dispersa que é dispersa na fase externa. Um agente emulsificante pode ou não também estar presente.

Os tipos diferentes de emulsões podem ser definidos pela referência ao tipo de líquido que forma a fase externa 30 versus o tipo de líquido que forma a fase dispersa. A este respeito, quando uma fase de óleo é dispersa em uma fase de água, a emulsão é denominada "emulsão do tipo óleo-em-água" ou "emulsão normal". No entanto, também possível formar uma

"emulsão inversa ou do tipo água-em-óleo (w/o)". Em uma emulsão inversa, as gotas de água são dispersas em uma fase contínua de óleo.

Quando são formadas as nanocápsulas, inicialmente a emulsão do tipo água-em-óleo é formada, e essa emulsão do tipo água-em-óleo é convertida em um emulsão do tipo óleo-em-água pela adição de água à fase de óleo/orgânica. Sem ficar limitado pela teoria, acredita-se que em consequência disto os polímeros no sistema são depositados na interface entre o óleo e a água, aprisionando todas as gotas internas de óleo e isolando as mesmas da fase aquosa contínua. A emulsão resultante que compreende as gotas de óleo revestidas com o(s) polímero(s) de revestimento é misturada então com a solução de polímero formador de gel. Uma vez que a emulsão do tipo óleo-em-água é formada e o polímero formador de gel é adicionado, o solvente (ou a mistura de solventes) e a água são essencialmente removidos.

Há diversas técnicas disponíveis para remover um solvente (ou a combinação de solventes) de uma emulsão, como é sabido pelos elementos versados na técnica, incluindo o aquecimento e a evaporação do solvente, a evaporação do solvente volátil seguida pela liofilização, etc. De acordo com a invenção, o solvente é preferivelmente removido por meio de secagem por aspersão, uma vez que os agentes ativos não são sensíveis ao calor. No caso em que os agentes ativos são sensíveis ao calor, outros métodos para remover o solvente de uma emulsão podem ser utilizados, tal como é sabido e apreciado pelos elementos versados na técnica.

A secagem por aspersão é um método de microencapsulação mecânica desenvolvido nos anos trinta. Consequentemente, a emulsão é atomizada em uma aspersão de gotas mediante o bombeamento da pasta através de um disco rotativo ao compartimento aquecido de uma secadora de

aspersão. Ali, o solvente, bem como a água na emulsão, são evaporado para obter as microesferas secos.

As microesferas secas resultantes podem ser formuladas de acordo com qualquer aplicação desejada. Há
5 aplicações quase ilimitadas para tal material microencapsulado. Dependendo, entre outros, do agente ativo, as microesferas podem ser aplicáveis na agricultura, em produtos farmacêuticos, em alimentos, em cosméticos e em
10 fragrâncias, têxteis, papel, tintas, revestimentos e adesivos, aplicações de impressão, e muitas outras indústrias.

De acordo com uma realização preferida, as microesferas são para o uso na medicina, nos cosméticos ou em diagnósticos.

15 Mais preferivelmente, as microesferas secas são formuladas como uma composição farmacêutica, preferivelmente para a administração oral. Para esta finalidade, as microesferas secas podem ser encerradas em um veículo entérico, tal como uma cápsula entérica. Os exemplos não-
20 limitadores de cápsulas entéricas incluem cápsulas entero-revestidas moles ou duras tal como é sabido no estado da técnica.

Deve ser observado que, quando as microesferas secos são protegidas dos fluidos gástricos pelo uso de tal
25 veículo entérico, as gotas de óleo (nas nanocápsulas) não precisam ser revestidas com um polímero que seja solúvel a um pH acima de 5,0. Em outras palavras, uma combinação de um polímero solúvel em água e de um polímero insolúvel em água é aplicável.

30 Por outro lado, ao utilizar uma mistura de polímeros que compreende um polímero que seja solúvel somente a um pH acima de 5,0, outras formas de aplicação das microesferas são possíveis, tal como na forma de sachês.

Desse modo, deve ficar compreendido que, dependendo do tipo específico de formulação, um farmacêutico ou qualquer outro formulador podem determinar a combinação específica dos polímeros a serem utilizados de acordo com a invenção.

5 Para comprimidos de aplicação oral, pílulas, pós, losangos, sachês, cachês, elixires, suspensões, aerossóis (como um sólido ou em um meio líquido), e pós acondicionados estéreis, bem como outras formas de aplicação, podem ser utilizados.

10 Foi demonstrado que as microesferas da invenção conferem níveis elevados no sangue dos agentes ativos exemplificados em comparação aos produtos comerciais ou a uma formulação de emulsão (denominada óleo na seção Resultados).

De acordo com uma realização, as microcápsulas da
15 invenção propiciam a liberação controlada do agente ativo. Conforme aqui empregado, "liberação controlada" refere-se a qualquer tipo de liberação que não seja a liberação imediata. Por exemplo, a liberação controlada pode ser projetada como liberação modificada, estendida, sustentada, retardada,
20 prolongada ou constante (isto é, da ordem zero). Em teoria, um dos perfis mais úteis da liberação é a liberação constante por um período de tempo predeterminado. É contemplado que a liberação controlada do agente é obtida pelo revestimento aplicado às gotas e que o perfil da liberação do agente ativo
25 pode ser ditado por variações na composição dos polímeros que formam o envoltório. O revestimento de polímero de controla da taxa também pode ser obtido pela aplicação de uma pluralidade de revestimentos de misturas de polímeros sobre a gota do núcleo tal como é sabido no estado da técnica.

30 Deve ser observado que, através do método da invenção, as microesferas são construídas de maneira tal que não há nenhum contato direto entre o agente ativo e o polímero formador de gel (que pode ser uma mistura de

polímeros formadores de gel). Além disso, deve ser observado que o método da invenção permite qualquer excesso de polímeros formadores de envoltório seja misturado com o polímero formador de gel, isto é, que faz parte do revestimento de microesferas sobre as nanocápsulas. Desse modo, com o contato do produto final com um ambiente aquoso, o polímero formador de gel se transforma em uma geléia e intumesce, enquanto o excesso de polímero(s) solúvel(is) em água ou polímero(s) solúvel(is) a um pH acima de 5,0 que foram misturados com o polímero formador de gel é dissolvido. Sem ficar limitado pela teoria, acredita-se que por meio desta combinação do polímero formador de gel e do excesso do outro polímero (utilizado na construção da parede da nanocápsula) na estrutura de microesferas, as nanocápsulas intactas que compreendem o agente ativo são liberadas da microesfera (previsivelmente através das aberturas formadas na microesfera em consequência da dissolução dos polímeros solúveis) e não a droga em sua forma livre. Acredita-se, outra vez, sem ficar limitado pela teoria, que a liberação das nanocápsulas do gel e não a droga em sua forma livre, permite o escape do agente de efluxo de P-gp e desse modo a sua absorção pelos vasos linfáticos.

A invenção também apresenta um método para aumentar a biodisponibilidade de um agente ativo no corpo de um indivíduo humano, sendo que o método compreende a provisão ao dito indivíduo das microesferas da invenção. Os resultados aqui apresentados mostram que, através do uso das microesferas de acordo com a invenção, a biodisponibilidade da invenção dos agentes ativos testados no sangue pode aumentar, pelo menos por um fator de 1,3, preferivelmente por um fator de 2, e mais preferivelmente por um fator de 3, com respeito às drogas de controle utilizadas (vide, por exemplo, a Figura 12).

A invenção também apresenta um método de tratamento de um indivíduo para uma condição patológica que requer para o dito tratamento uma quantidade eficaz de um agente ativo dentro do sistema sangüíneo do indivíduo, sendo que o método
5 compreende a provisão ao dito indivíduo das microesferas da invenção.

A expressão "condição patológica" aqui empregada denota qualquer condição que requer a melhora do bem estar do indivíduo na aplicação de um agente ativo que é uma droga ou
10 uma pró-droga ou um agente de diagnóstico, tais como aqueles listados acima. Quando o agente ativo é uma entidade não-hidrofílica, tal como, sem fica limitado à teoria, um agente lipofílico ou um agente anfipático, ou qualquer derivado lipofílico/anfipático de um agente ativo, a aplicação do
15 agente ativo de acordo com a invenção é preferivelmente feita através do transporte linfático. A lista não-limitadora das condições inclui, entre outras, a inflamação e distúrbios autoimunes, parasitismo (por exemplo, malária), infecção bacteriana, viral ou fúngica, distúrbios cardíacos (por
20 exemplo, arritmia), distúrbios de coagulação, depressão, diabetes, epilepsia, enxaqueca, câncer, distúrbios imunológicos, distúrbios hormonais, condições psiquiátricas, distúrbios do trato gastrointestinal, distúrbis nutritivos, e muitos outros, tal como é sabido no estado da técnica.

25 A quantidade eficaz de agente ativo na composição farmacêutica e na forma de dosagem unitária da mesma pode ser variada ou ajustada amplamente, dependendo da aplicação particular, da maneira ou da introdução, da potência do agente ativo particular, do carregamento do agente na
30 nanocápsula, e da concentração desejada. A quantidade eficaz é determinada tipicamente em experimentações clínicas apropriadamente projetadas (estudos de faixa de dosagem) e o elemento versado na técnica irá saber realizar corretamente

tais experimentações a fim de determinar a quantidade eficaz. Conforme é geralmente sabido, uma quantidade eficaz depende de uma variedade de fatores incluindo a capacidade hidrofóbica do agente ativo e, quando relevante, da
5 capacidade lipofílica/anfipática, da seleção dos polímeros que formam a nanocápsula (o revestimento da gota de óleo) e/ou do envelope formador de gel externo, do perfil de distribuição do agente ativo dentro do corpo depois de ser liberado da nanocápsula, uma variedade de parâmetros
10 farmacológicos, tal como a meia vida no corpo, de efeitos colaterais indesejados, se existirem, e de fatores tais como a idade e o gênero, etc.

A expressão "forma de dosagem unitária" refere-se a unidades fisicamente distintas apropriadas como dosagens
15 unitárias para indivíduos humanos e outros mamíferos, em que cada unidade contém uma quantidade predeterminada do agente ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com excipientes farmacêuticos apropriados. A concentração do agente terapeuticamente ativo pode variar.

20 A composição da invenção pode ser administrada por um período de tempo prolongado em uma única dose diária, em diversos doses ao dia, como uma única dose e em diversos dias, etc. O período de tratamento terá geralmente uma extensão proporcional à extensão do processo da doença e da
25 eficácia da microesfera específica (por exemplo, aplicação eficaz através do sistema linfático, eficácia do agente, etc.) e a espécie do paciente que está sendo tratado.

Conforme apreciado, embora a invenção seja descrita na seguinte descrição detalhada com referência a microesferas
30 e aos métodos para a sua preparação, deve ficar compreendido que dentro da presente invenção também são englobadas as composições farmacêuticas que compreendem as mesmas e os métodos terapêuticos que empregam as mesmas, bem como

qualquer outro uso das microesferas.

Conforme empregado no relatório descritivo e nas reivindicações, as forma "um", "uma" e "o/a" incluem o referências no singular bem como no plural, a menos que o contexto dite claramente de alguma outra maneira. Por exemplo, a expressão "um polímero" inclui um ou mais polímeros e a expressão "óleo" inclui um ou mais óleos.

Além disso, tal como aqui empregado, a expressão "que compreende" presta-se a indicar que as microesferas incluem os elementos recitados, mas não excluem outros. A expressão "que consiste essencialmente em" é empregada para definir as microesferas que incluem os elementos recitados mas excluem outros elementos que podem ter um significado essencial na biodisponibilidade do agente lipofílico dentro do corpo de um indivíduo. Por exemplo, as microesferas que consistem essencialmente em gotas de óleo revestidas por um polímero solúvel em água (independente do pH) não irão incluir nem incluem somente quantidades insignificantes (quantidades que terão um efeito insignificante na liberação do agente não-hidrofílico da microesfera) de polímeros que são dependentes do pH com respeito à sua solubilidade, tais como polímeros entéricos. "Que consiste em" deverá significar desse modo a exclusão de mais do que elementos de traço de outros elementos. As realizações definidas por cada um destes termos de transição estão dentro do âmbito da presente invenção.

Além disso, todos os valores numéricos, por exemplo, quando se referem às quantidades ou faixas dos elementos que constituem as microesferas, são aproximações que são variadas (+) ou (-) por até 20%, algumas vezes por até 10% dos valores indicados. Deve ficar compreendido, mesmo que nem sempre esteja indicado explicitamente, que todas as referências numéricas são precedidas pelo termo

"aproximadamente".

DESCRIÇÃO DE ALGUMAS REALIZAÇÕES NÃO-LIMITADORAS

Exemplo 1: Nanocápsulas acomodadas em microesferas

Materiais e Métodos

5 Materiais

Poli(arilato de etila, metacrilato de metila, cloreto de metacrilato de trimetilamonioetila 1:2:0,2 (Eudragit RL), poli(acrilato de etila, metacrilato de metila, cloreto de metacrilato de trimetilamonioetila 1:2:0,1
 10 (Eudragit RS PO) e poli(ácido metacrílico, acrilato de etila) 1:1 (Eudragit L100-55) foram adquiridos junto à Rohm (Dramstadt, GmbH, Alemanha), ftalato de hidróxi propil metil celulose (HPMCP 55 NF) foi obtido junto à Eastman (Rochester, EUA). A hidróxi propil metil celulose (Methocel E4M Premium)
 15 foi adquirida junto à Dow Chemical Company (Midland, MI, EUA), a metil celulose (Metolose 90SH 100.000) foi obtida junto à Shin-Etsu (Tóquio, Japão), o óleo do argan foi adquirido junto à Alban-Muller (Vincenny, França), os glicerídeos oléicos polioxietoxilados (Labrafil M 1944 CS) foram
 20 gentilmente doados pela Gattefosse (St. Priest, França), o palmitato de dexametasona (DXPL) foi sintetizado tal como descrito em 2.1, o tacrolimus (como monoidrato) foi adquirido junto à Concord Biotech Limited (Ahmedabad, Índia), a anfotericina B pode ser adquirida junto à Alfarma (Lote
 25 N:A1960561). Outros produtos químicos e solventes eram de grau de reagente analítico e água duplamente destilada foi utilizada por todo o estudo.

Métodos

Preparação das Nanocápsulas

30 Várias formulações preliminares foram preparadas tal como descrito nas Tabelas 1 e 2.

Duas abordagens de adição de solvente diferentes foram utilizadas no presente estudo para a preparação das

nanocápsulas. A primeira abordagem é baseada no método bem estabelecido de Fessi et al. [Fessi H, et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int. J. Pharm, 1989 55:R1-R4 (1989)] ao utilizar a deposição interfacial de um polímero de revestimento depois do deslocamento de um sistema de cosolvente semi-polar (acetona:etanol; 19:1) miscível com água de uma fase de óleo/orgânica. A solução de acetona que compreende a fase de óleo, o tensoativo lipofílico, os polímeros de revestimento (polímeros formadores dos envelopes das nanocápsulas) e a respectiva droga é despejada em uma solução aquosa que compreende eventualmente um estabilizante da emulsão. A fase aquosa fica imediatamente leitosa com uma opalescência azulada em consequência da formação das nanocápsulas (Tabela 1). Ao passo que, nas formulações de nanocápsulas apresentadas na Tabela 2, a fase de água é adicionada lentamente à fase de acetona:etanol/orgânica, conduzindo primeiramente à formação de uma microemulsão do tipo água-em-óleo que, com a adição contínua da água, resulta em uma emulsão inversa do tipo óleo-em-água, resultando na formação de nanocápsulas depois do deslocamento dos solventes dipolares.

Tabela 1: Composição de formulações de nanocápsulas preparadas pela difusão do deslocamento de acetona interfacial de acordo com o método de Fessi et al. (24=26)

	Composição da fase orgânica						Fase aquosa		
Nº.	Acetona:Etanol (19:1), ml	Óleo* ml	1º Polímero, g		2º Polímero, g		Água, ml	Methocel E4M, g	Comentários
1	40	1	Eud. RL	0,90	HPMCP	0,10	150	1	
2	40	1	Eud. RL	0,90	HPMCP	0,10	150	1	
3	40	1	Eud. RL	0,90	HPMCP	0,10	150	0	Com fluorescente
4	40	1	Eud. RL	0,90	HPMCP	0,10	150	0	Com fluorescente
5	40	1	Eud. RL	0,90	-	-	150	1	

6	40	1	Eud. RL	0,95	HPMCP	0,05	150	1	
7	100	0,6	Eud. RL	0,95	HPMCP	0,05	250	1	
8	-	0,6	Eud. RL	0,95	HPMCP	0,05	250	1	100 ml de etanol
9	50	0,6	Eud. RL	0,95	HPMCP	0,05	250	1	
10	50	0,6	Eud. RL	0,90	Eud.	0,10	250	1	
11	100	0,6	Eud. RL	0,90	Eud.	0,10	250	1	
12	100	0,6	Eud. RS	0,90	Eud.	0,10	250	0	
13	100	0,6	Eud. RS	0,90	Eud.	0,10	200	1	
14	100	0,6	Eud. RS	0,90	Eud.	0,10	200	1	
15	100	0,6	Eud. RS	0,90	Eud.	0,10	200	0	Com lactose
16	100	0,6	Eud. RS	0,25	Eud.	0,75	75	1	
17	100	0,6	Eud. RS	0,50	Eud.	0,50	75	1	
18	100	0,6	Eud. RS	0,75	Eud.	0,25	75	1	

* A fase de óleo compreendia: óleo de argan: Labrafil M 1944 CS; 5:1 e DXPL a uma concentração constante de 5% com respeito ao volume de óleo de argan.

5 Tabela 2: Composição de formulações de nanocápsulas preparadas pela nanodeposição interfacial de polímero ao utilizar o processo de extração de solvente depois da inversão de fase da emulsão (a fase aquosa é despejada na fase acetônica)

	Fase aquosa		Composição da fase orgânica						
Nº.	Água, ml	Methocel E4M, g	Acetona:Etanol (19:1), ml	Óleo, ml	1º Polímero, g		2º Polímero, g		Comentários
19	75	1	100	0,5	Eud. RS	0,90	Eud. L100-55	0,10	
20	75	1	100	0,5	-	-	-	-	
21	75	0	100	0,5	-	-	-	-	Com lactose
22	75	0	100	0,5	Eud. RS	0,75	Eud. L100-55	0,25	Com lactose
25	75	0	100	0,5	Eud. RS	0,25	Eud. L100-55	0,75	Com
26	75	0	100	0,5	Eud. RS	0,25	Eud. L100-	0,75	Com Eud.

							55		
27	75	0	100	0,5	Eud. RS	0,25	Eud. L100- 55	0,75	Com Eud.
28	75	1	100	0,5	Eud. RS	0,25	Eud. L100- 55	0,75	
29	75	1	100	0,5	Eud. RS	0,25	Eud. L100- 55	0,75	
30	75	1	100	0,5	Eud. RS	0,75	Eud. L100- 55	0,25	
31	75	1	100	0,5	Eud. RS	0,25	Eud. L100- 55	0,75	

*A fase de óleo compreendia: óleo de argan: Labrafil M 1944 CS; 5:1 e DXPL a uma concentração constante de 5% com respeito ao volume do óleo de argan ou Tacrolimus a uma concentração constante de 4% com respeito ao volume de óleo de argan.

Deve ser enfatizado que o tacrolimus é uma droga muito cara e tóxica que precisa ser processada cuidadosamente. Portanto, foi decidido realizar experiências preliminares com um palmitato de dexametasona (DXPL), uma droga lipofílica que serviu como uma droga modelo particularmente para a avaliação das experiências cinéticas de liberação in vitro.

Síntese do palmitato de dexametasona

Dexametasona (1 equivalente) foi dissolvida em piridina secada recentemente (2,5 ml de piridina para cada grama de dexametasona). A solução resultante foi diluída 1 a 5 com diclorometano e resfriada até 4°C em um banho de gelo (solução A). Cloreto de palmitoila (1,2 equivalente, Aldrich) foi dissolvido em diclorometano (15 ml de diclorometano para cada grama de cloreto de palmitoila) e também resfriado até 0°C (solução B). A solução B foi transferida para um funil de equalização de pressão e adicionada por gotejamento à solução A agitada vigorosamente e resfriada. Depois de completada a

adição (trinta minutos para 5 g de dexametasona), a mistura de reação foi purgada com nitrogênio, tampada e colocada para agitar durante toda a noite no banho de gelo. Uma amostra foi tirada na manhã seguinte para a avaliação do progresso da reação através de cromatografia de camada fina, eluída por acetato de etila:hexano (3:1 em volume). Três picos principais foram normalmente obtidos: o primeiro representa a dexametasona, o segundo é o cloreto de palmitoila e o terceiro representa o produto palmitato de dexametasona. No caso de a reação não ser completada, a mistura é colocada para agitar por mais doze horas. Ao final deste período, o solvente orgânico é removido sob pressão reduzida (não aquecido até mais de 60°C). Ao resíduo, são adicionados 100 ml de uma mistura 2:1 de acetato de etila:hexano. A suspensão resultante é agitada vigorosamente e filtrada através de um funil Buckner. O semisólido é lavado com acetato de etila e o material filtrado resultante é separado. A camada orgânica é lavada duas vezes com 100 ml de uma solução fria de hidróxido de sódio a 5%, duas vezes com água e uma vez com uma solução saturada de cloreto de sódio. A camada orgânica é filtrada sobre sulfato de sódio anidro e evaporada até secar. O resíduo é dissolvido em um volume mínimo de clorofórmio e aplicado a uma coluna de sílica (40 cm de comprimento) para a cromatografia de vaporização. A coluna é eluída com clorofórmio:hexano (1:1) e as frações ricas em palmitato de dexametasona são combinadas, evaporadas até secar, e a pureza do produto é verificado através de HPLC. O rendimento é realmente de 60%.

Preparação de nanocápsulas de Tacrolimus

Eudragit RS, Eudragit L100 55, Labrafil 1944 CS, óleo de argan e tacrolimus nas concentrações indicadas na Tabela 3 foram dissolvidos em 100 ml de uma solução de acetona:etanol (90:10) (fase de óleo). 75 ml de água foram

adicionados (dentro de dois minutos) à fase de óleo para formar uma dispersão. À solução dispersa, 200 ml de uma solução de metil celulose a 0,5% foram adicionados antes do procedimento de secagem por aspersão. A metil celulose e a
 5 última porção de água são adicionadas somente após a formação das nanocápsulas. A menos que esteja indicado de alguma outra maneira, a metil celulose refere-se a Methocel E4M.

Três formulações são aqui exemplificadas: Formulações números 29 e 30, em que os seus conteúdos estão
 10 descritos nas Tabelas 3, 4. Estas formulações diferem pelas suas proporções de polímeros: Eudragit RS:Eudragit L100-55 25:75 ou 75:25, respectivamente. Uma outra formulação é a formulação número 32 que tem conteúdos similares aos da formulação número 29, no entanto, sem Eudragit RS e Eudragit
 15 L100-55.

Tabela 3: Composição da formulação de nanocápsulas número 29
 *A formulação 32 é idêntica no conteúdo à formulação 29 sem Eudragit RS e Eudragit L100-55.

Número	Nome do Material	Quantidade	Unidade
1	Acetona	95	ml
2	Eudragit RS*	0,25	g
3	Eudragit L100-55*	0,75	g
4	Etanol	5	ml
5	Óleo de argan	0,5	ml
6	Labrafil M 1944 CS	0,1	ml
7	Tacrolimus	20	mg
8	Água deionizada	75	ml
9	Methocel E4M	1	g
10	Água deionizada	200	ml

Tabela 4: Composição da formulação de nanocápsulas número 30

Número	Nome do Material	Quantidade	Unidade
1	Acetona	95	ml
2	Eudragit RS	0,75	g
3	Eudragit L100-55	0,25	g
4	Etanol	5	ml
5	Óleo de argan	0,5	ml

6	Labrafil M 1944 CS	0,1	ml
7	Tacrolimus	20	mg
8	Água deionizada	75	ml
9	Methocel E4M	1	g
10	Água deionizada	200	ml

Preparação das nanocápsulas de anfotericina B

Eudragit RS, Eudragit L100 55, Labrafil 1944 CS, óleo de argan e (anfotericina solubilizada com ácido acético) nas concentrações indicadas na Tabela 3 foram dissolvidos em 100 ml de uma solução de acetona:etanol (90:10) (a "fase orgânica"). 75 ml de água foram adicionados (dentro de dois minutos) à fase orgânica, resultando na formação de uma dispersão. À solução dispersa, 200 ml de uma solução de hidróxi propil metil celulose a 0,5% foram adicionados antes do procedimento de secagem por aspersão. A hidróxi propil metil celulose e a última porção de água são adicionadas somente após a formação das nanocápsulas, e a hidróxi propil metil celulose refere-se a Methocel E4M. A formulação das nanocápsulas é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Composição da formulação de nanocápsulas de anfotericina A

Número	Nome do Material	Quantidade
1	Acetona	90 ml
2	Eudragit RS	0,25 g
3	Eudragit L100-55	0,75 g
4	Etanol	10 ml
5	Óleo de argan	1 ml
6	Labrafil M 1944 CS	0,2 ml
7	Tacrolimus	60 mg
8	Água deionizada	75 ml
9	Methocel E4M	1 g
10	Água deionizada	200 ml

Microencapsulação de nanocápsulas de tacrolimus ou anfotericina B pelo método de secagem por aspersão

A suspensão foi secada por aspersão com um aparelho minisecador por aspersão B-190 Buchi (Flawil, Suíça) sob as seguintes condições: temperatura de entrada 180°C; temperatura de saída 113°C; aspiração 50%; a taxa de

alimentação da suspensão era de 2,5 ml/min. onde o pó foi coletado no separador de ciclone e o rendimento da saída foi calculado.

Caracterização físico-química das nanocápsulas de tacrolimus

5 e das microcápsulas subseqüentes

Conteúdo da droga

A quantidade total de tacrolimus no pó foi analisada ao dissolver a amostra em 5 ml de PBS. Depois que o polímero foi dissolvido, 1 ml de acetonitrilo (ACN) foi
10 adicionado e a mistura foi agitada (100 rpm) por uma hora. Em seguida, 3 ml de acetato de etila foram adicionados e a mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 4.000 rpm por cinco minutos.

A extração do tacrolimus pelo acetato de etila foi
15 repetida três vezes para assegurar a remoção total da droga da mistura. As camadas diferentes de acetato de etila (camada superior) foram transferidas a um tubo limpo e evaporadas sob o ar até secar. Os resíduos combinados foram dissolvidos em 1 ml de ACN, e 50 µl foram injetados na HPLC sob as seguintes
20 condições: Fase móvel - Acetonitrilo a 100%, Vazão - 0,5 ml/min, comprimento de onda 213 nm, coluna - LiChrosfer® 100 RP-18 (5 µm), 4/120 mm. Uma curva de calibração construída a partir de concentrações de tacrolimus que variam entre 5 e 250 µg/ml resultou em uma correlação linear. Foi verificado
25 que o limite de detecção de tacrolimus é de 3,9 µg/ml.

O rendimento da incorporação de tacrolimus foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{Rendimento da droga (\%)} = \frac{\text{Quantidade de droga detectada}}{\text{Quantidade de droga incorporada}} \times 100\%$$

30 A quantidade total de anfotericina B no pó foi analisada ao dissolver a amostra em 5 ml de sulfóxido de dimetila (DMSO). Depois que o polímero foi dissolvido, a mistura foi agitada (100 rpm) por uma hora. Em seguida, a

concentração de anfotericina B foi detectada pelo espectrofotômetro ao comprimento de onda de 407 nm. Uma curva de calibração construída a partir das concentrações de anfotericina B que variam de 0,781 a 100 µg/ml resultou em
5 uma correlação linear (com $R^2 = 0,999$). Foi verificado que o teor de anfotericina B do pó secado pos aspersão é de 0,85% em peso/peso.

Teor de DXPL

A quantidade total da droga no pó foi analisada ao
10 dissolver a amostra em 5 ml de PBS. Depois que o polímero foi dissolvido, 5 ml de metanol foram adicionados e a mistura foi agitada (100 rpm) por uma hora. Em seguida, 3 ml de diclorometano foram adicionados e a mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 4.000 rpm por cinco minutos. A
15 extração de DXPL por diclorometano foi repetida três vezes para assegurar a remoção total da droga da mistura. As camadas diferentes de diclorometano (camada inferior) foram transferidas a um tubo limpo e evaporadas sob ar até secar. Os resíduos combinados foram dissolvidos em 100 µl de
20 metanol, e 50 µl foram injetados na HPLC sob as seguintes condições: Fase móvel - metanol a 100%, Vazão - 0,7 ml/min, comprimento de onda - 242 nm, coluna - LiChrosfer® 100 RP-18 (5 µm), 4/120 mm.

Uma curva de calibração construída a partir das
25 concentrações de DXPL que variam entre 0,01 e 5 ng/ml resultou em uma correlação linear.

Foi verificado que o limite de detecção de DXPL é de 9,8 ng/ml.

O rendimento da incorporação de DXPL foi calculado
30 pela seguinte equação:

$$\text{Rendimento da droga (\%)} = \frac{\text{Quantidade de droga detectada}}{\text{Quantidade de droga incorporada}} \times 100\%$$

Avaliação da cinética de liberação in vitro de DXPL das micropartículas

Devido às limitações do limite de detecção de tacrolilnus quando as condição de dissipação prevalecem, as
5 experiências cinéticas in vitro foram realizadas com DXPL ao utilizar a técnica de ultrafiltração sem nenhuma pressão [Magenhiem B, et al. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers-ultrafiltration technique at low pressure. Int. J. Pharm.
10 94:115-123 (1993)].

O dispositivo de célula de ultrafiltração Amicon (Amicon Corp, Danvers, Mass, EUA), foi utilizado. O filtro utilizado era TEPT ISOPORE™ de 8,0 µm (Millipore, Bedford, MA, EUA). Neste estudo, as condições de dissipação da
15 liberação foram combinadas. Uma amostra de micropartícula (5 mg) foi colocada em 100 ml do meio de liberação (acetonitrilo a 10% em tampão de fosfato a um pH 7,4 que não alterou a estabilidade física das nanocápsulas). A determinados intervalos de tempo, a amostra de 0,5 ml do meio de liberação
20 foi coletada através do filtro de 8,0 µm, o que permitiu que as nanocápsulas se difundissem através de tal filtro. Então, 0,5 ml de metanol foi adicionado e turbilhonado para solubilizar as nanocápsulas. Em seguida, 3 ml de diclorometano foram adicionados e a mistura foi turbilhonada
25 vigorosamente, e em seguida centrifugada a 4.000 rpm por cinco minutos. Após a centrifugação, a camada de diclorometano (camada inferior) foi transferida a um tubo limpo e evaporada sob ar até secar. O resíduo foi dissolvido em 200 µl de metanol, e 50 µl foram injetados à HPLC sob as
30 condições descritas anteriormente.

Determinação do tamanho de partícula das nanocápsulas preliminares e das microesferas secundárias

As medições dos tamanhos das nanocápsulas foram

feita ao utilizar um Dimensionador de Partículas de Alto Desempenho de Retro-Varredura Não-Invasivo ALV (ALV-NIBS HPPS; Langen, Alemanha) a 25°C e ao utilizar a água como solvente. Um feixe laser a um comprimento de onda de 632 nm foi utilizado. A faixa de sensibilidade era de 0,5 nm a 5 µm. As micropartículas secadas por aspersão foram avaliadas qualitativamente através de microscopia eletrônica de varredura.

Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

10 A avaliação morfológica das nanocápsulas e das microesferas secadas por aspersão foi efetuada ao utilizar a microscopia eletrônica de varredura (modelo: Quanta 200, FEI, Alemanha). As amostras foram fixadas em um topo SEM ao utilizar fita adesiva de frente e verso e então se tornaram
15 eletricamente condutoras seguindo o revestimento padrão por salpicamento de ouro (pilaron E5100) sob vácuo.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A avaliação morfológica das nanocápsulas foi efetuada ao utilizar a análise TEM. A amostra foi colocada em
20 uma grade de cobre revestida com colódio estabilizada com carbono por um minuto, e manchada com ácido fosfotúngstico a 1% (PTA). As amostras foram secadas e examinadas por TEM (Phillips CM-12; Philips, Eindhoven, Holanda).

Estudos de absorção em ratos

25 O estudo foi aprovado pelo comitê ético local de cuidados com animais de laboratório de acordo com as regras e diretrizes relacionadas com o cuidado e o uso de animais de laboratório MD 104.01-3. Ratos Sprague Dawley pesando 300-325 g foram utilizados neste estudo. Os animais foram abrigados
30 em condições de SPF, e jejuaram por 24 horas antes da experiência. Na manhã seguinte, os animais foram dosados através de gavagem oral, no estado em jejum, com 0,2 mg/rato de tacrolimus formulado como uma suspensão de conteúdo de

cápsula de Prograf® (lote - 5C5129B exp. - 06/2007, Fujisawa Ltd. Reino Unido) (CAPS), uma emulsão do tipo óleo-em-água (ÓLEO), ou como a nova DDS (formulações números 29 e 30) ou formulação 32.

5 As amostras de sangue (100-150 µl) foram tiradas da cauda dos ratos em 0, 30 minutos e em 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a administração da dosagem. As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo heparina. As amostras foram congeladas imediatamente a -20°C e analisadas quanto aos
10 níveis de tacrolimus ao utilizar o kit PRO-Trac™ II ELISA (DiaSorin, EUA) ao seguir o protocolo sugerido pela empresa. Este método ELISA é bem aceito na prática clínica e pode detectar com precisão níveis de tacrolimus de 0,3 a 30 ng/ml de tacrolimus no sangue.

15 Cálculos da biodisponibilidade

Cada rato foi dosado com 160 µg/kg de tacrolimus por I.V. de bolus ao utilizar o concentrado original de Prograf® para a ampola de infusão de 5 mg/ml (lote: A3098H exp: 11/06, Fujisawa Ltd. Reino Unido). As amostras de sangue
20 (100-150 µl) foram tiradas da cauda do animal em 5, 30 minutos e em 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas. As amostras foram tratadas e analisadas tal como descrito acima. Os parâmetros farmacocinéticos das formulações diferentes foram calculados ao utilizar o software WinNonlin (versão 4.0.1), utilizando a
25 regra do trapezóide para o cálculo de AUC.

A biodisponibilidade absoluta das formulações orais diferentes foi calculada ao utilizar a seguinte equação:

$$\text{Biodisponibilidade absoluta (\%)} = \frac{\text{AUC}_{\text{oral}}}{\text{AUC}_{\text{IV}}} \times 100\%$$

30 A biodisponibilidade relativa de qualquer formulação oral comparada à formulação comercializada padrão (CAPS) foi calculada ao utilizar a seguinte equação:

$$\text{Biodisponibilidade relativa (\%)} = \frac{\text{AUC}_{\text{oral}}}{\text{AUC}_{\text{oral}}} \times 100\%$$

AUC_{caps}Avaliação da estabilidade do núcleo de óleo em condições experimentais diferentes

A estabilidade química do tacrolimus em óleo de argan/labrafil em uma armazenagem de longa duração a 37°C em condições experimentais diferentes foi avaliada depois da dissolução de 5 mg de tacrolimus em 300 µl de uma solução 5:1 de óleo de argan:Labrafil (AL SOL). Vários excipientes antioxidantes também foram dissolvidos na formulação de óleo tal como descrito na Tabela 6. Algumas das formulações armazenadas em frascos de vidro bem fechados foram purgadas com nitrogênio para assegurar condições atmosféricas inertes. Tabela 6: Composição da formulação de óleo de 1,66% de tacrolimus

Formulação	Tipo de antioxidante, % em peso/volume da fase de óleo
AL SOL. 1	Vitamina E 0,05 + N ₂
AL SOL. 2	BHT 0,05, galato de propila 0,05 + N ₂
AL SOL. 3	BHT 0,05, galato de propila 0,05
AL SOL. 4	N ₂
AL SOL. 5	Formulação de óleo puro

15 Estudos de absorção em miniporcos

Miniporcos pesando 18-21 kg foram utilizados neste estudo. Os estudos de absorção foram realizados ao utilizar uma administração oral de 1 mg de tacrolimus para cada animal, formulado como um produto comercial de cápsula de gelatin de Prograf® (Prod. Com.), e a nova cápsula de gelatina de DDS ao utilizar uma mistura diferente de Eudragit (Nov. DDS = formulação 29).

Procedimentos Cirúrgicos: Todos os procedimentos cirúrgicos e experimentais foram revistos e aprovados pelo Animal Care and Use Committee of the Hebrew University (MD 117.04-3). Porcos pequenos pesando 18-21 kg foram utilizados para todos os estudos. Os animais jejuaram durante toda a noite; o acesso livre a uma água potável foi permitido durante todo o estudo. Na manhã seguinte, os animais foram anestesiados por

isofloran (máscara) por um período curto (dez minutos). Durante este período, os animais foram:

- (1) dosados oralmente, no estado em jejum, com 1 mg por animal de tacrolimus formulado como produto comercial de cápsula de Prograf®, e como Nov. DDS;
- (2) um cateter foi introduzido na veia jugular para a amostragem do sangue e foi fixado no dorso do porco. As amostras de sangue (1 ml) foram tiradas em 0, 15 minutos, 30 minutos e em 1, 1,5, 2, 3, 4, 8, 12 e 24 horas e coletadas em tubos contendo heparina (o animal estava consciente durante a experiência).

As amostras foram congeladas imediatamente a -20°C, e analisadas quanto aos níveis de tacrolimus ao utilizar o kit PRO-Trac™ II ELISA (DiaSorin, EUA).

15 Resultados e Discussão

Análise morfológica

Surpreendentemente, quando a fase de água foi adicionada lentamente à fase orgânica (Tabela 2); primeiramente, a água dispersa na fase de óleo, e então, após a adição de um volume de água estimado como igual a 15 ml de água em 100 ml da solução acetônica, uma emulsão do tipo óleo-em-água foi formada tal como evidenciado pela formação rápida de opalescência no meio de dispersão. Neste estágio, a difusão rápida da fase interna de acetona/etanol para a fase aquosa externa ocorreu, resultando na deposição de polímeros hidrofóbico na interface do tipo óleo-em-água e na formação de nanocápsulas que consistem em um núcleo de óleo revestido pela mistura de polímeros de Eudragit tal como ilustrado na Figura 1, onde a relação final entre a solução de acetona e a água era de 100:75 em volume/volume. Deve ser enfatizado que sob uma concentração idêntica da mistura de Eudragit, mas na ausência de óleo, os fenômenos de separação de fase de Eudragit e opalescência que refletiram a separação dos

polímeros da solução acetônica, ocorreram após a adição de 45 e 35 ml de água nas formulações números 29 e 30, respectivamente. Esta diferença pode ser devida à relação diferente entre Eudragit RS e Eudragit L100-55 na mistura entre as formulações 29 e 30. Aparentemente, quando a água é adicionada lentamente à fase de acetona:etanol/óleo que compreende o tensoativo labrafil que exibe um valor baixo de HLB igual a 4, uma micro-emulsão do tipo água-em-óleo transparente é formada e nenhuma separação de fase é observada. Com a adição progressiva e contínua da água, a uma determinada relação de volume hidrofílico:lipofílico, uma emulsão inversa do tipo óleo-em-água é formada espontaneamente, seguida imediatamente pelo deslocamento (difusão) da acetona e do etanol para a fase aquosa externa, conduzindo à deposição da mistura de polímero de Eudragit hidrofóbico na interface do tipo óleo-em-água das gotas de óleo, resultando na formação do envelope de nanocápsula em torno do núcleo de óleo de argan onde a droga e o tensoativo são dissolvidos. Neste estágio onde somente 75 ml de água foram adicionados, a película da mistura de Eudragit em torno das nanocápsulas ainda se encontra parcialmente hidratada e fina, tal como observado nas Figuras 1A e 1B. Com uma adição adicional de 200 ml de uma solução de metil celulose a 0,5%, ocorreu uma extração completa da acetona e do etanol das nanocápsulas, e uma película mais rígida de Eudragit é formada, tal como pode ser deduzido dos dados apresentados nas Figuras 2A e 2B. Grandes agregados de nanocápsulas são formados devido à presença da metil celulose e à elevada concentração das nanocápsulas na dispersão. A película rígida do polímero em torno das gotas de óleo é distinta e pode ser facilmente identificada em comparação à película fina baseada nas nanocápsulas visualizadas nas Figuras 1A e 1B.

Isto foi ainda confirmado quando a formulação

número 30 foi diluída com 75 ml de água sem a solução de metil celulose (isto é, 100:75, volume/volume). Uma deposição interfacial mais pronunciada da mistura de Eudragit ocorreu e uma película rígida de Eudragit cuja espessura foi estimada qualitativamente como igual a 30 nm foi formada tal como mostrado nas Figuras 3A e 3B. Certamente, a solubilidade desta mistura específica é menor do que a solubilidade da mistura de Eudragit na formulação 29 que se separou mais tarde quando pelo menos 45 ml de água foram adicionados em vez de 35 ml para a formulação 30. Nenhuma fase de óleo ou gota de óleo é detectadas ao empregar esta abordagem tal como descrito na Tabela 2. A distribuição de tamanho da partícula da formulação de dispersão de nanocápsula número 29 selecionada exibiu uma faixa estreita com um diâmetro médio de 479 nm (Figura 4).

A análise SEM confirmou os resultados TEM precedentes e revela nanocápsulas individuais formadas depois da adição de 75 ml de água na formulação 29 (Figuras 5A e 5B). No entanto, depois da adição da solução de metil celulose e da secagem por aspersão, microesferas esféricas (que variam qualitativamente no tamanho de 2 a 5 μm) que formam agregados pequenos (que variam qualitativamente no tamanho de 10 a 30 μm) podem ser detectadas (Figuras 6A e 6B). Além disso, não foi possível distinguir nenhuma morfologia estrutural regular depois da imersão do agregado secado por aspersão no meio de liberação a um pH 7,4 por três horas (Figuras 7A e 7B). Realmente, a mistura de película formadora de Eudragit na formulação número 29 compreendia Eudragit L100 55:Eudragit RS 75:25. Eudragit L100-55 é imediatamente solúvel acima de um pH 5,5, ao passo que Eudragit RS é insolúvel independentemente do pH. Desse modo, o revestimento primário de metil celulose e o revestimento secundário da mistura de Eudragit da nanocápsula são

dissolvidos rapidamente e nenhuma estrutura definida pode ser identificada. No entanto, pode ser observado a partir da análise SEM (Figuras 8A-8D) que a formulação número 30, depois da secagem por aspersão, resultou em menos agregados e estruturas mais esféricas que são esvaziadas em consequência do vácuo. Além disso, nas Figuras 9A e 9B, numerosas nanocápsulas podem ser detectadas dentro dos núcleos vazios de microesfera depois da imersão no meio de liberação por três horas, o que evidencia as descobertas que o revestimento de nanocápsula da mistura de Eudragit que compreende Eudragit RS:Eudragit L100 55, 75:25, é mais resistente ao meio de liberação aquoso e deve controlar a liberação da droga encapsulada com o passar do tempo.

Avaliação cinética de liberação in vitro

Os dados de liberação in vitro podem sugerir que a liberação do agente dos microesferas pode ser controlada por variações no revestimento de polímero aplicado em torno das gotas de óleo. Conforme pode ser observado na Figura 10, o perfil de liberação de DXPL é mais rápido com o Eudragit L:RS, 75:25 do que com o RS:L, 75:25, indicando que o Eudragit L é mais rapidamente permeável e resultou em taxas de liberação rápidas do que o Eudragit RS.

A Figura 11 mostra os resultados onde a emulsão de submicra de DXPL sem revestimento de Eudragit foi secada por aspersão sob condições experimentais idênticas às da formulação número 29. Ambos os tipos de microesferas resultaram em perfis de liberação similares. Em vez de DXPL dissolvido e de liberação de nanocápsula carregada com DXPL, DXPL dissolvido e pequenas gotas de óleo carregadas com DXPL foram liberados, refletindo a mesma quantidade liberada total de DXPL para ambas as experiências. Estas descobertas sugerem que as experiências cinéticas de liberação não podem se diferenciar entre DXPL dissolvido e DXPL incorporado em gotas

de óleo ou nanocápsulas.

Avaliação da estabilidade do tacrolimus dissolvido no núcleo de óleo da nanocápsula em condições experimentais diferentes

5 Pode ser deduzido a partir dos dados indicados na Tabela 7 que o tacrolimus não é estável depois de um mês de armazenagem a 37°C quando dissolvido em uma formulação de óleo mesmo sob a atmosfera de nitrogênio e na presença de vários antioxidantes, a menos que seja formulado com BHT e galato de propila e combinado com a atmosfera de nitrogênio.

10 Avaliação da estabilidade de nanocápsulas de tacrolimus microencapsuladas armazenadas à temperatura ambiente

A formulação seca final de nanocápsulas de tacrolimus microencapsuladas foi armazenada em recipientes de plástico bem fechados à temperatura ambiente. A formulação número 29 foi analisada após três e quatro meses e foi verificado que o teor de tacrolimus foi determinado ao utilizar HPLC é de 99 e 95% do teor inicial, respectivamente. A estabilidade do produto de extremidade à temperatura ambiente está sob monitoramento contínuo. A formulação selecionada final será sujeitada aos testes de estabilidade acelerada no futuro próximo.

Tabela 7: Avaliação do teor de tacrolimus no núcleo de óleo como uma função dos parâmetros da formulação quando armazenado a 37°C.

Formulação	Antioxidante	1 semana % de teor inicial	1 mês % de teor inicial
AL SOL. 1	Vitamina E + N ₂	92,2	84,4
AL SOL. 2	BHT, galato de propila + N ₂	117,6	115,5
AL SOL. 3	BHT, galato de propila	99,7	82,0
AL SOL. 4	N ₂	84,9	59,8
AL SOL. 5	Nenhum	113,1	85,2

25 Estudos de absorção em ratos

Conforme mencionado anteriormente, o tacrolimus é associado com uma biodisponibilidade é uma farmacocinética marcadamente variáveis depois da administração oral. Foi

sugerido que a permeabilidade jejunal intrínseca do tacrolimus é bastante elevada. A dependência regional da permeabilidade do tacrolimus também foi examinada, e os estudos revelaram que a permeabilidade do tacrolimus diminuiu drasticamente no íleo e no cólon em comparação àquela no jejuno. Nesse caso, muito da variabilidade do tacrolimus parece resultar de outros fatores tais como o efeito dos mecanismos de efluxo de P-glicoproteína (PGP) ou do efeito do metabolismo de CYP3A que pode ser responsável pela dependência regional observada (5). Realmente, foi relatado que os efeitos combinados de CYP3A e de P-gp na absorção intestinal e na biodisponibilidade oral são grandes barreiras à aplicação oral da droga de tacrolimus [Kagayama A, et al., Oral absorption of FK506 in rats. Pharm. Res. 10:1446-50 (1993)]. Foram feitas tentativas para melhorar a absorção de tacrolimus ao transferir seletivamente a droga ao sistema linfático por meio de uma emulsão de ácido oléico do tipo óleo-em-água (15). Os autores administraram oralmente a emulsão de tacrolimus aos ratos a doses de 2 e 1 mg/kg e a compararam ao produto comercial. Foi observado que a redução da dose de 2 mg/kg para 1 mg/kg diminuiu significativamente o C_{max} no sangue dos ratos de $36,3 \pm 18,3$ para $8,5 \pm 4,8$ e de $32,1 \pm 9,6$ para $6,0 \pm 2,2$ ng/ml para as formas de dosagem comercial e de emulsão, respectivamente. Resultados similares foram relatados com a administração oral de tacrolimus em uma forma de dosagem de dispersão aos ratos alimentados a doses de 1, 3,2 e 10 mg/kg que resultou em valores de C_{max} de $8,8 \pm 4,9$, $11,6 \pm 5,3$ e $40,2 \pm 19,4$ ng/ml.

Os resultados atuais mostram que uma administração oral do produto comercial (CAPS) a uma dose de 0,7 mg/kg resultou em um C_{max} de $1,1 \pm 0,8$ ng/ml, bem abaixo dos valores relatados, mostrando claramente uma influência significativa

da dose administrada sobre o valor de $C_{\max}$. Além disso, a emulsão resultou em um valor de $C_{\max}$ de $2,2 \pm 0,46$ ng/ml, ao passo que a formulação número 29 resultou em valor de $C_{\max}$ de $11,1 \pm 2,7$ ng/ml tal como indicado na Tabela 8.

5 Além disso, o perfil de absorção acarretado pela formulação 29 era significativamente melhor do que os perfis acarretados pela emulsão e pelo produto comercial (Figura 12). No entanto, a Formulação 30 não resultou em um perfil de liberação aumentado em comparação à formulação 29 (Figura 10 13).

Além disso, os níveis de tacrolimus no sangue depois de uma absorção oral de 0,7 mg/kg de tacrolimus dosados em várias formulações aos ratos (média $\pm$ SD, $n = 3-6$, $p > 0,05$) foram determinados (Figura 14). Os estudos de 15 absorção dos ratos foram realizados ao utilizar a gavagem oral, com 0,7 mg/kg (0,2 mg/rato) de tacrolimus formulado tanto como uma suspensão de produto comercial de cápsula de Prograf® (Prod. Com.), uma emulsão (Emuls.), uma emulsão embutida nos microesferas sem Eudragits mas com metil 20 celulose (Emuls. Seca), sem metil celulose mas com nanocápsulas de Eudragit e lactose como um agente de secagem por aspersão (Sem Methocel).

Em vista do desempenho menor da formulação 30, foi decidido avaliar a reproducibilidade do processo de 25 manufatura de nanocápsulas carregadas com tacrolimus microencapsuladas obtidas na formulação 29. Pode ser deduzido a partir dos dados apresentados na Figura 15 que os perfis de absorção acarretados pela Formulação 31 que é idêntica à Formulação 29 são próximos dos perfis acarretados pela 30 Formulação 29.

Levando em consideração a variabilidade elevada da absorção de tacrolimus, estas descobertas sugerem que os parâmetros do processo são bem controlados e reproduzíveis.

Além disso, pode ser deduzido a partir dos dados apresentados an Figura 16 que aparentemente a Formulação número 29 pode ter contribuído para o desvio do fígado do tacrolimus e promover alguma absorção linfática do tacrolimus resultando em uma biodisponibilidade mais intensificada em comparação ao produto comercial.

Para calcular a biodisponibilidade absoluta da formulação oral, um estudo farmacocinético intravenoso foi realizado, e os dados são apresentados na Figura 17. A biodisponibilidade absoluta das formulações orais estava abaixo de 12%, confirmando os dados já relatados sobre a biodisponibilidade do tacrolimus (Tabela 8). No entanto, os resultados obtidos com a Formulação número 29 mostram que a biodisponibilidade foi aumentada em 490% no que diz respeito à formulação comercial de cápsula tal como mostrado na Tabela 8 onde os valores de AUC_{0-24} e de C_{max} são mostrados para todas as formulações. Também deve ser lembrado que a formulação de emulsão aumentou a biodisponibilidade relativa em 210% em comparação ao produto comercial, mas resultou em somente 42,8% da biodisponibilidade da Formulação 29 tal como refletido dos respectivos valores de AUC_{0-24} mostrados na Tabela 8. A maior absorção oral do tacrolimus pelas nanocápsulas microencapsuladas reais (as microesferas da invenção) pode ser mediado pela absorção linfática intestinal. A absorção de micro- e nanopartículas pelo epitelium gastrointestinal é agora um fenômeno extensamente aceito e levou os pesquisadores a focalizar nesta rota de aplicação para moléculas lábeis ao utilizar carreadores microparticulados (29).

Tabela 8: Parâmetros farmacocinéticos e cálculos da biodisponibilidade

Formulação	Cmax	AUC, ng/ml/h	Biodisponibilidade absoluta, %	Biodisponibilidade relativa, %
------------	------	--------------	--------------------------------	--------------------------------

Prograf® I.V.	-	360 ± 24,6	-	-
29	11,1 ± 2,7	39,5 ± 21,6	11,0	490,2
ÓLEO (EMULS)	2,2 ± 0,5	17,0 ± 9,5	4,7	210,6
Prograf® em cápsulas	1,1 ± 0,8	8,1 ± 3,5	2,2	-
32	1,4 ± 0,3	10,4 ± 5,4	2,8	125,8

Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que a formação das nanocápsulas é importante para o desempenho do sistema de aplicação. Uma emulsão simples não pode reter o tacrolimus dentro do núcleo de óleo, resultando em uma
 5 degradação do metabolismo pré-sistêmica marcante do tacrolimus refletida claramente pelos resultados acarretados pela formulação 32 que é idêntica no conteúdo à formulação 29 mas sem a mistura de Eudragit que forma a parede de revestimento da nanocápsula.

10 Além disso, os preparados histopatológicos foram retirados do duodenum do rato, trinta minutos após uma gavagem oral da formulação número 29. Os preparados foram examinados pelo microscópio fluorescente e as nanocápsulas foram detectadas facilmente em várias regiões do tecido.
 15 Estas descobertas sugerem que as partículas também passam pela endocitose em enterócitos normais.

Por outro lado, uma agregação pronunciada de nanopartículas foi encontrada em uma região do emplastro de Peyer (Figura 18). A presença de um número grande
 20 significativo de nanocápsulas no emplastro de Peyer foi sugerida desse modo como sendo indicativa de um escape potencial do efluxo de P-gp e sua absorção pelos vasos linfáticos, permitindo a liberação do conteúdo da cápsula na circulação de sangue sistêmico que contorna o efeito de
 25 primeira passagem do fígado.

Além disso, foram tiradas fotomicrografias diferentes do que segue (Figuras 19A-19D):

- nanocápsulas vazias microencapsuladas secas preparadas com

revestimento de nanocápsula de Eudragit L:RS (75:25) e revestimento de matriz de metil celulose (Figura 19A);

- nanocápsulas vazias microencapsuladas impregnadas preparadas com nanocápsula de Eudragit L:RS (75:25) revestida e revestimento de matriz de metil celulose depois de uma incubação por três minutos com tampão de fosfato (pH 7,4) (Figura 19B);

- nanocápsulas vazias microencapsuladas impregnadas preparadas com nanocápsula de Eudragit L:RS (75:25) revestida e revestimento de matriz de metil celulose depois de uma incubação por cinco minutos com tampão de fosfato (pH 4,8) (Figuras 19C e 19D, em que a Figura 19D é a ampliação de uma seção da Figura 19C).

Os resultados indicados pelas micrografias conduziram à sugestão que as matrizes de microesfera não compreendiam somente a metil celulose, mas também um excesso de Eudragit RS e L que não participou da formação do revestimento de nanocápsula. Desse modo, a um pH menor do que 5, nenhuma formação de geléia e intumescimento rápido das matrizes foram observados, ao passo que, a um pH de 7,4 o Eudragit L se dissolveu rapidamente e contribuiu para a formação de geléia e o intumescimento rápido das matrizes e a liberação das nanocápsulas das microesferas.

Sem ficar limitados pela teoria, desse modo foi suposto que a absorção oral incrementada de um agente ativo pelas nanocápsulas microencapsuladas é mediada pela absorção linfático intestinal das partículas.

Isto também é evidente a partir dos resultados obtidos quando formulações idênticas no conteúdo à Formulação número 29, sem o revestimento de nanocápsula de polímero de Eudragit, não acarretaram uma biodisponibilidade maior tal como observado na Figura 17 (Emul. e Emuls Seca) e na Tabela 8 acima.

Além disso, sem ficar limitados pela teoria, foi sugerido que o sistema de aplicação de acordo com a invenção pode não apenas somente promover a absorção linfática, mas também escapar também da degradação pré-metabolismo e do efluxo de P-gp. A emulsão normal, embora com uma biodisponibilidade incrementada em comparação ao produto comercial mas não até a mesma extensão que a formulação 29, provavelmente como uma consequência da divisão do tacrolimus nos fluidos GI (gastrointestinais) antes de sua absorção pelos enterócitos.

Desse modo, o sistema da aplicação da invenção pode ser preferivelmente aplicável para a aplicação de vários agentes ativos que agem ou são considerados como substratos do efluxo de P-gp.

Além disso, as descobertas acima apresentadas mostraram que a emulsão seca, que se assemelha à formulação número 29 mas sem o revestimento de nanocápsula de polímero de Eudragit, não foi capaz de reter o tacrolimus no núcleo de óleo nos fluidos gastrointestinais, resultando em uma biodisponibilidade mais pobre do que o produto comercial.

Adicionalmente, as nanocápsulas de Eudragit sem Methocel não resultaram em níveis marcantes do sangue, indicando que o revestimento de nanocápsula real não foi capaz de reter o tacrolimus sob as condições experimentais atuais, e não pôde contribuir para a prevenção do efluxo de tacrolimus.

Estas descobertas foram confirmadas por uma experiência animal cruzada de quatro mini-porcos. Os resultados apresentados na Figura 19 e na Tabela 9 abaixo mostram que o sistema de aplicação da invenção, tal como exemplificado pela formulação 29, resultou em níveis de droga 2,4 vezes maiores, contribuídos pelo desvio do fígado do tacrolimus, resultando em uma biodisponibilidade incrementada

em comparação ao produto comercial (Prograf®).

Tabela 9: Parâmetros farmacocinéticos e cálculos da biodisponibilidade em mini-porcos (média $\pm$ SD, n = 4)

Formulação nº.	AUC	t _{1/2} , h	T _{max} , h	C _{max} (ng/ml)	Biodisponibilidade relativa, %
29	44,0	7,48	3	10,14	243,5
Prograf®	18,06	9,11	2	3,76	100,0

Fica evidente a partir dos resultados apresentados nos estudos de absorção nos mini-porcos que a bioavaiablilidade relativa alcançada pelo sistema de aplicação de droga da invenção era 2,4 vezes maior do que a formulação testada.

Na presente invenção, em vista dos resultados totais apresentados, uma explanação mecanística plausível de como o novo sistema de aplicação de droga incrementa significativamente a absorção oral da droga pode desse modo envolver, sem ficar limitado pela teoria, (a) uma absorção endocitótica - partículas absorvidas pelos enterócitos intestinais através da endocitose (tamanho de partícula < 500 nm); (b) uma absorção linfática - partículas adsorvidas por células M de emplastros Peyer (tamanho de partícula < 5 μ m) e (c) uma aderência aumentada das microesferas e das nanocápsulas ao epitelium intestinal acarretada pelo revestimento bioadesivo adequado de hidróxi propil metil celulose, resultando globalmente em uma melhoria marcante da absorção nas células intestinais devido à capacidade de escapar das proteínas da bomba de resistência de múltiplas drogas.

REIVINDICAÇÕES

1. MICROESFERAS, caracterizadas pelo fato de compreender uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero formador de gel, em que a pluralidade de nanocápsulas compreende um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-hidrofílico e um envoltório de revestimento polimérico.
2. MICROESFERAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo fato de que o dito revestimento polimérico compreende pelo menos um polímero que é insolúvel ou solúvel em água a um pH acima de aproximadamente 5,0, ou uma combinação dos mesmos.
3. MICROESFERAS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizadas pelo fato de que o dito revestimento polimérico compreende uma combinação de pelo menos dois polímeros.
4. MICROESFERAS, de acordo com a reivindicação 3, caracterizadas pelo fato de que a dita combinação de pelo menos dois polímeros compreende pelo menos um polímero que é solúvel a um pH acima de aproximadamente 5,0 e pelo menos um polímero que é insolúvel em água.
5. MICROESFERAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizadas pelo fato de que o dito polímero que é solúvel a um pH acima de aproximadamente 5,0 é selecionado entre ftalato de hidróxi propil metil celulose (HPMPC), ftalato de acetato de celulose, ftalato de carbóxi metil celulose, shellac, Eudragit 1.100-55, e zeína.
6. MICROESFERAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, caracterizadas pelo fato de que o dito polímero que é insolúvel em água é selecionado entre etil celulose, Eudragit RS, Eudragit RL, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) e copolímeros de PLA e PGA (PLAGA), e etil celulose.

7. MICROESFERAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 6, caracterizadas pelo fato de que a combinação dos polímeros compreende pelo menos dois polímeros, um primeiro polímero que é insolúvel em água e um
5 segundo polímero que é solúvel a um pH acima de aproximadamente 5,0, e a relação entre o polímero insolúvel em água e o polímero solúvel a um pH acima de aproximadamente 5,0 fica compreendida na faixa entre 5:95 e 70:30.

8. MICROESFERAS, de acordo com qualquer uma das
10 reivindicações 3 a 7, caracterizadas pelo fato de que a dita combinação de pelo menos dois polímeros compreende uma mistura de um primeiro polímero selecionado entre Eudragit RL ou Eudragit RS e um segundo polímero selecionado entre Eudragit L100-55 e ftalato de hidróxi propil metil celulose
15 (HPMPC).

9. MICROESFERAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizadas pelo fato de que as ditas nanocápsulas têm um diâmetro médio entre aproximadamente 100 nm e 900 nm.

20 10. MICROESFERAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizadas pelo fato de que o dito polímero formador de gel é caracterizado por ser pelo menos um dos seguintes: um polímero solúvel em água; ou um polímero que intumescce na presença de água.

25 11. MICROESFERAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizadas pelo fato de que o dito polímero formador de gel é celulose modificada.

12. MICROESFERAS, de acordo com a reivindicação 11, caracterizadas pelo fato de que a dita celulose
30 modificada é selecionada entre hidróxi etil celulose, hidróxi propil metil celulose, carbóxi metil celulose sódica, ftalato de hidróxi propil metil ou acetato, ftalato acetato de celulose, ftalato de metil celulose, e celulose

microcristalina.

13. MICROESFERAS, de acordo com a reivindicação 10, caracterizadas pelo fato de que o dito polímero solúvel em água é selecionado entre hidróxi propil metil celulose, metil celulose de pesos moleculares baixos, e polietileno glicol de peso molecular acima de 5.000.

14. MICROESFERAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizadas pelo fato de que as ditas microesferas têm um diâmetro médio entre aproximadamente 5 µm e aproximadamente 500 µm.

15. MICROESFERAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizadas pelo fato de que o dito agente ativo é substrato de bomba de efluxo de P-gp.

16. MICROESFERAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizadas pelo fato de que o dito agente ativo é agente ativo lipofílico ou um agente ativo anfipático.

17. MICROESFERAS, de acordo com a reivindicação 16, caracterizadas pelo fato de que o dito agente ativo lipofílico é uma droga selecionada entre tacrolimus, sirolimus halofantrine, ritonavir, loprinavir, ainprenavir, saquinavir, calcitrol, dronabinol, isotretinoin, tretinoin, base de risperidona, e ácido valpróico.

18. MICROESFERAS, de acordo com a reivindicação 17, caracterizadas pelo fato de que o dito agente ativo lipofílico é um pró-medimento selecionado entre palmitato de dexametasona, palmitato de paclitaxel, e palmitato de docetaxel.

19. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS QUE COMPREENDEM UMA PLURALIDADE DE NANOCÁPSULAS ACOMODADAS EM UM POLÍMERO FORMADOR DE GEL, em que a pluralidade de nanocápsulas compreende um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-hidrofílico e um envoltório de revestimento

polimérico, em que o método é caracterizado pelo fato de compreender:

- (a) a provisão de uma fase orgânica que compreende óleo, um solvente orgânico miscível em água, um agente ativo
5 não-hidrofílico dissolvido no solvente e um polímero ou uma combinação de polímeros para revestir o dito núcleo de óleo;
- (b) a adição lenta de água à dita fase orgânica, para obter uma emulsão de água em óleo (a/o);
- (c) a adição contínua de água à emulsão de a/o,
10 para induzir a inversão da fase da emulsão, obtendo desse modo uma emulsão de óleo em água (o/a);
- (d) a mistura da dita emulsão de o/a com um polímero formador de gel ou uma combinação de polímeros formadores de gel;
- (e) a remoção do solvente orgânico e da água,
15 obtendo desse modo as ditas microesferas.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o dito solvente orgânico é selecionado entre etanol, metanol, acetona, acetato de etila,
20 e isopropanol.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que o dito revestimento polimérico compreende pelo menos um polímero que é insolúvel ou solúvel em água a um pH acima de aproximadamente 5,0, ou
25 uma combinação dos mesmos.

22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o dito revestimento polimérico compreende uma combinação de pelo menos dois polímeros.

23. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 22,
30 caracterizado pelo fato de que a dita combinação de pelo menos dois polímeros compreende pelo menos um polímero que é solúvel a um pH acima de aproximadamente 5,0 e pelo menos um polímero que é insolúvel em água.

24. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, caracterizado pelo fato de que o dito polímero que é solúvel a um pH acima de aproximadamente 5,0 é selecionado entre: ftalato de hidróxi propil metil celulose (HP55), ftalato de acetato de celulose, ftalato de carbóxi metil celulose, shellac, Eudragit L100-55, e zeína.

25. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24, caracterizado pelo fato de que o dito polímero que é insolúvel em água é selecionado entre etil celulose, Eudragit RS, Eudragit RL, ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímeros de PLA e PGA (PLAGA), e etil celulose.

26. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 25, caracterizado pelo fato de que a dita combinação de polímeros compreende dois polímeros, um primeiro polímero que é insolúvel em água e um segundo polímero que é solúvel a um pH acima de aproximadamente 5,0, e a relação entre o polímero insolúvel em água e o polímero solúvel ao pH acima de aproximadamente 5,0 fica compreendida na faixa entre 5:95 e 70:30.

27. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a dita combinação de polímeros compreende uma mistura de um primeiro polímero selecionado entre Eudragit RL ou Eudragit RS e um segundo polímero selecionado entre Eudragit L100-55 e ftalato de hidróxi propil metil celulose (HPMPC).

28. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a dita combinação de polímeros compreende Eudragit RS e Eudragit L100-55 a uma relação de aproximadamente 25:75.

29. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 28, caracterizado pelo fato de que a dita fase orgânica compreende excipientes lipofílicos.

30. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 29, caracterizado pelo fato de que a dita fase orgânica compreende um tensoativo lipofílico.

5 31. MICROESFERAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 31, caracterizadas pelo fato de que o dito polímero formador de gel é caracterizado por ser pelo menos um dos seguintes: um polímero solúvel em água; ou um polímero que intumesce na presença de água.

10 32. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 25, caracterizado pelo fato de que o dito polímero formador de gel é celulose modificada.

33. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a dita celulose modificada é selecionada entre hidróxi etil celulose, hidróxi propil metil
15 celulose, carbóxi metil celulose sódica, e celulose microcristalina.

34. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 27, caracterizado pelo fato de que o dito agente ativo é um substrato de bomba de efluxo de P-gp.

20 35. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 28, caracterizado pelo fato de que o dito agente ativo é um agente ativo lipofílico ou anfipático.

36. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o dito agente ativo lipofílico
25 é uma droga selecionada entre tacrolimus, sirolimus halofantrine, probucol, loprinavir, ritonavir, arnprenavir, saquinavir, calcitrol, dronabinol, isotretinoin, tretinoin, base de risperidona, e ácido valpróico.

30 37. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o dito agente ativo lipofílico é um pró-medicação selecionado entre palmitato de dexametasona, palmitato de paclitaxel, e palmitato de docetaxel.

38. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 31, caracterizado pelo fato de que a remoção do dito solvente orgânico pode ser obtida através da secagem por aspersão.

5 39. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo fato de compreender microesferas que compreendem uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero formador de gel e compreendem um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-hidrofílico e um envoltório de revestimento
10 polimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18.

40. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo fato de compreender microesferas que compreendem uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero
15 formador de gel e compreendem um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-hidrofílico e um envoltório de revestimento polimérico que podem ser obtidas pelo método de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 34.

41. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a
20 reivindicação 41, caracterizada pelo fato de estar em uma forma de dosagem para a administração oral.

42. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 34 ou 35, caracterizada pelo fato de ser uma composição farmacêutica seca.

25 43. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 34 a 36, caracterizada pelo fato de que as ditas microesferas compreendem um polímero formador de gel que é solúvel em água, e as microesferas são encerradas dentro de um veículo revestido entérico.

30 44. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que o dito veículo revestido entérico é uma cápsula revestida entérica.

45. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 34 a 38, caracterizada pelo fato de servir para a liberação controlada do dito agente ativo das ditas microesferas.

5 46. MÉTODO PARA AUMENTAR A BIODISPONIBILIDADE DE UM AGENTE LIPOFÍLICO NO CORPO DE UM INDIVÍDUO HUMANO, em que o método é caracterizado pelo fato de compreender a administração, ao dito indivíduo, das ditas microesferas que compreendem uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero formador de gel, em que as nanocápsulas compreendem
10 um núcleo de óleo que contém um agente lipofílico e um envoltório de revestimento polimérico.

47. MÉTODO DE TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO PARA UMA CONDIÇÃO PATOLÓGICA QUE REQUER UM NÍVEL EFICAZ AO SANGUE DE UM AGENTE ATIVO, em que o método é caracterizado pelo fato de
15 compreender a administração, ao dito indivíduo, de microesferas que compreendem uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero formador de gel, em que as nanocápsulas compreendem um núcleo de óleo que contém um agente lipofílico e um envoltório de revestimento polimérico.

20 48. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40 ou 41, caracterizado pelo fato de que as ditas microesferas são tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 18 ou as ditas microesferas podem ser obtidas pelo método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 32, e o
25 método compreende a aplicação das ditas microesferas ao dito indivíduo por os.

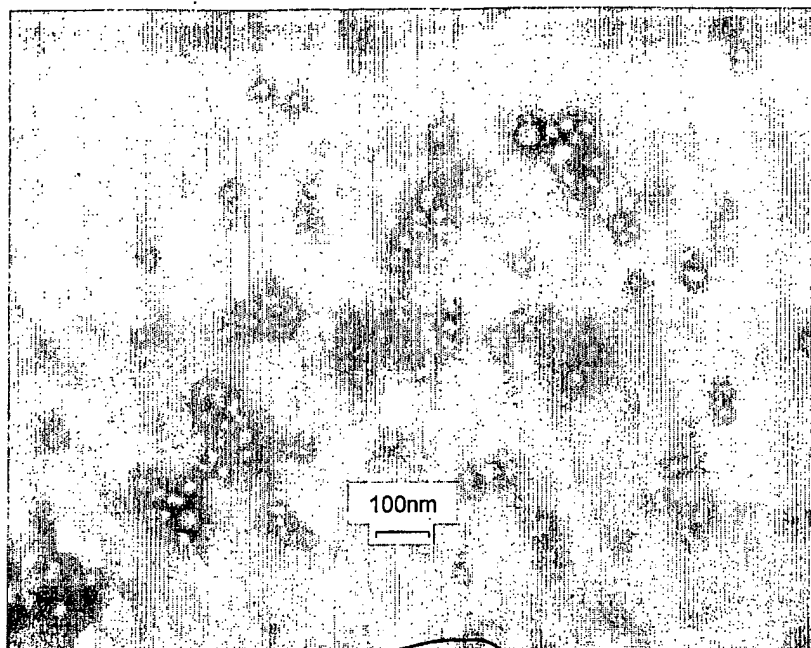


Fig. 1A

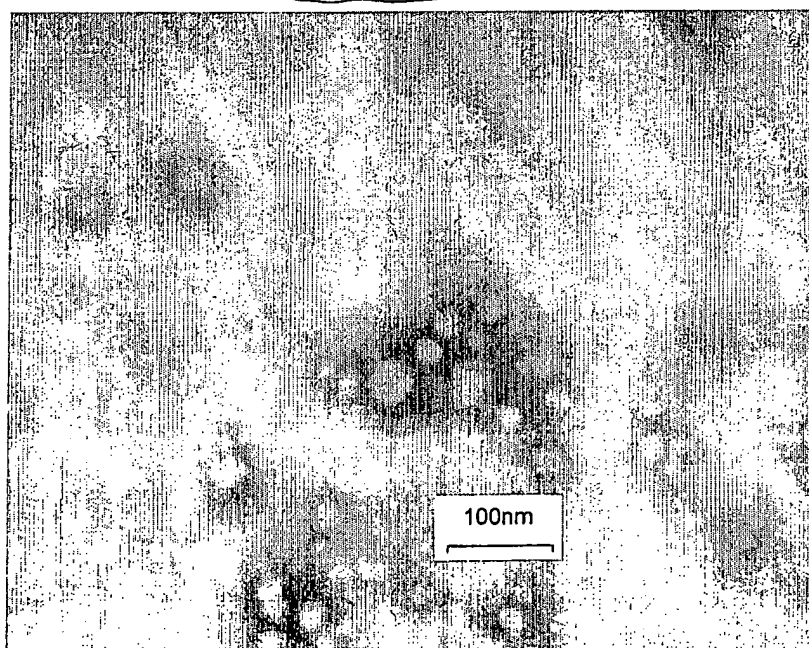


Fig. 1B

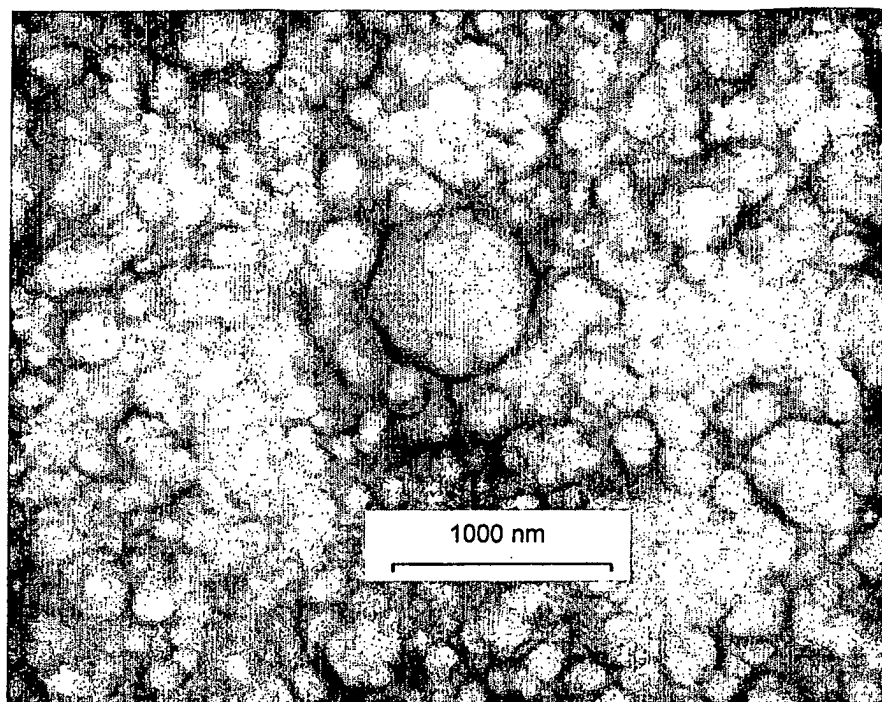


Fig. 2A

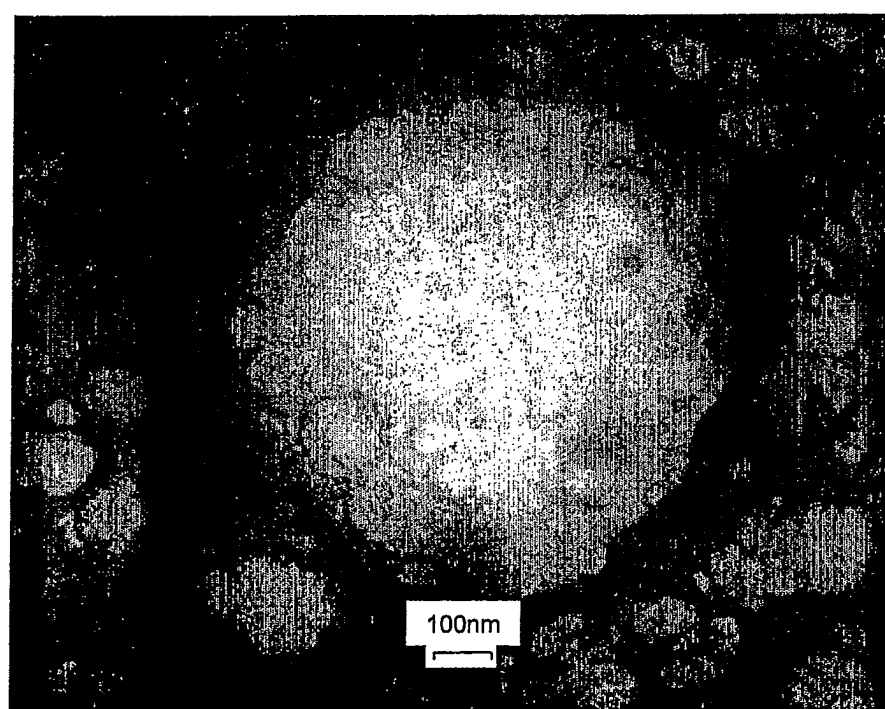


Fig. 2B

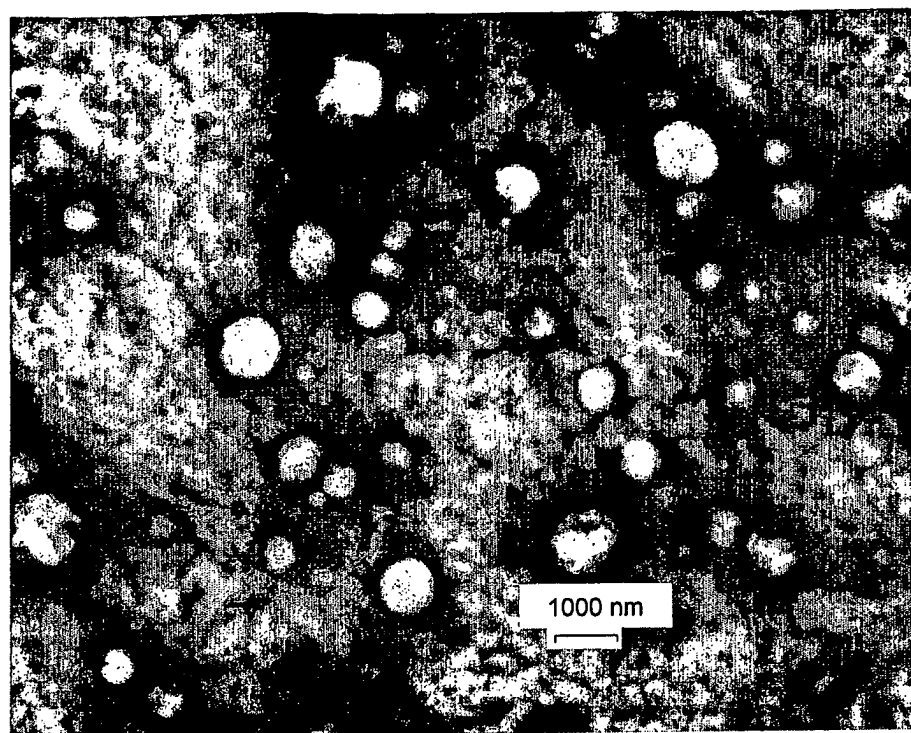


Fig. 3A

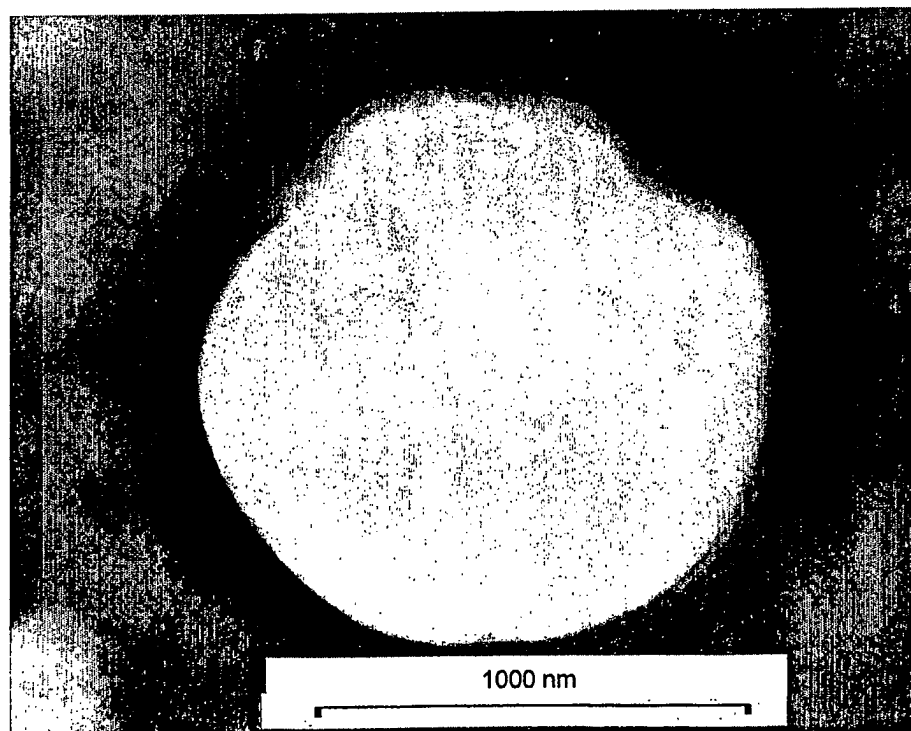


Fig. 3B

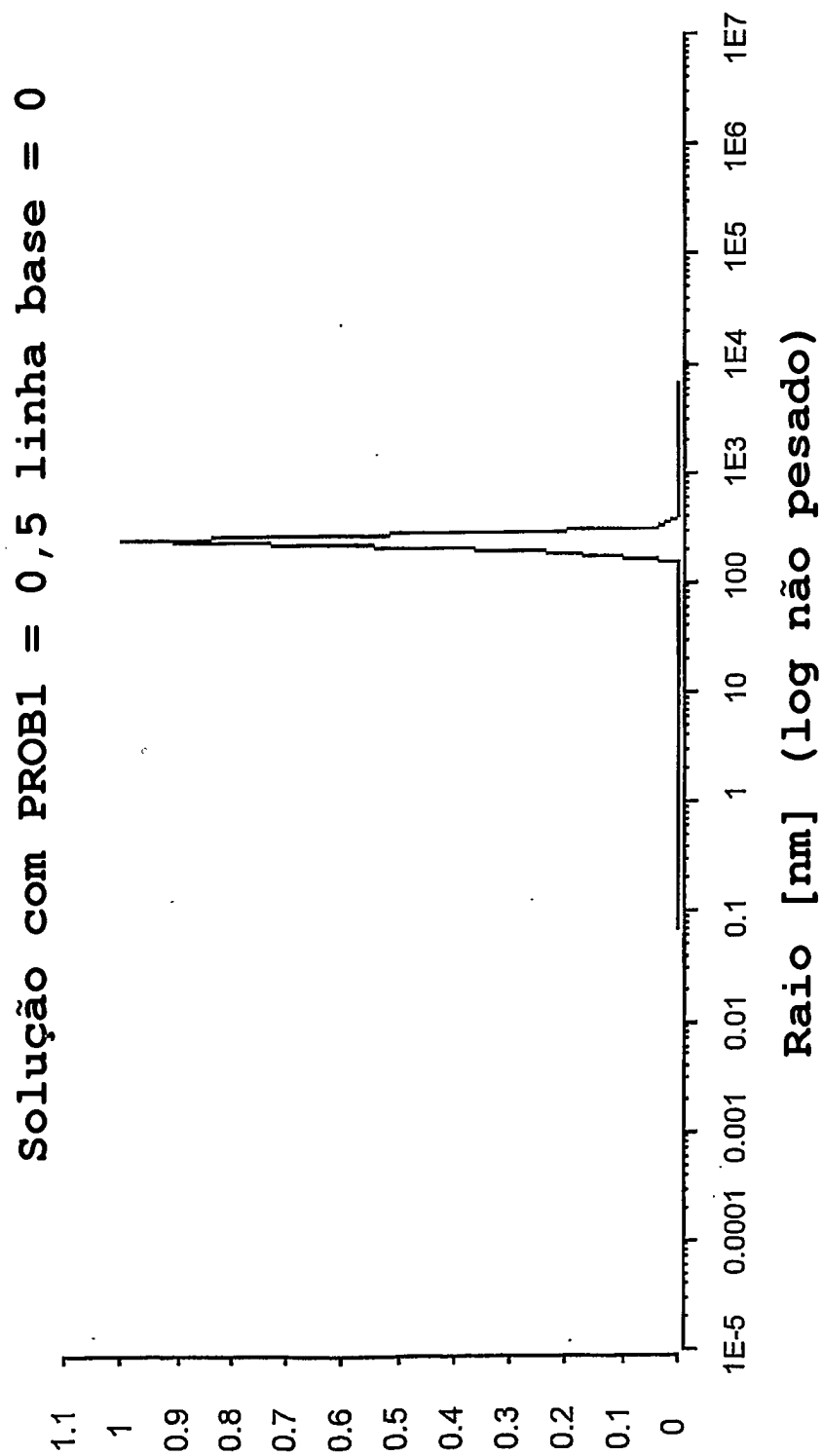


Fig. 4

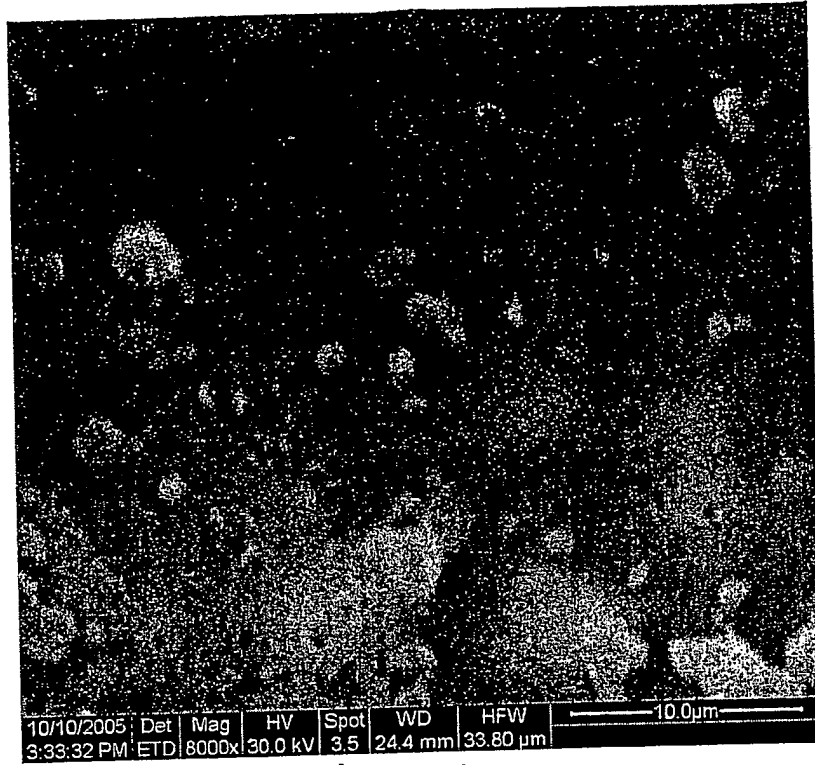


Fig. 5A

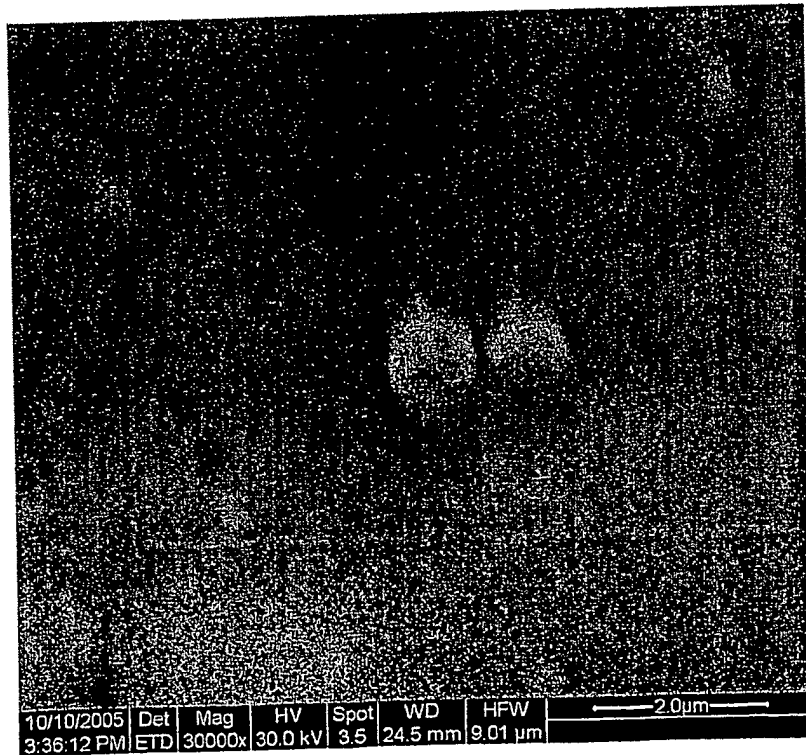


Fig. 5B

6/16

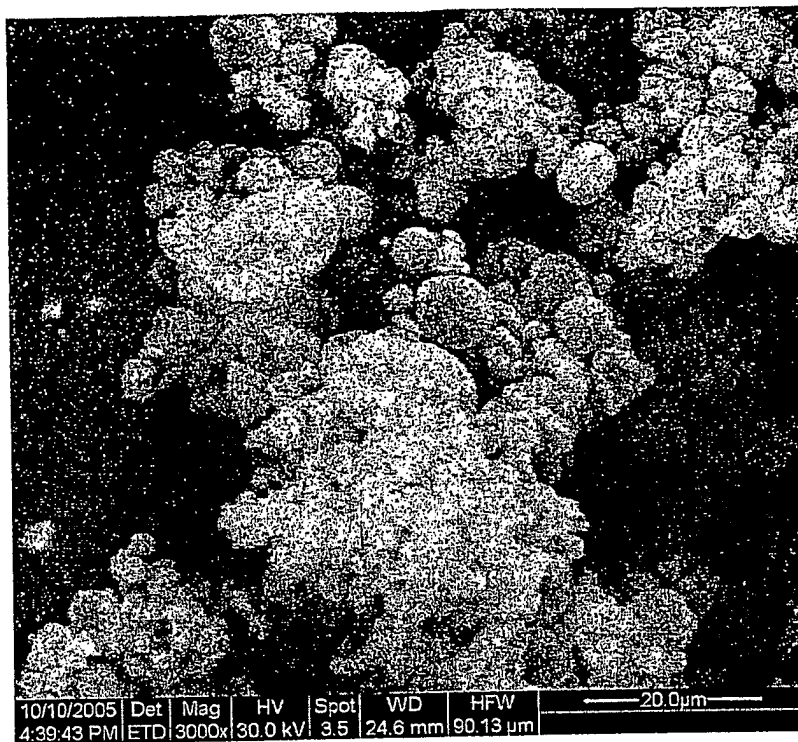


Fig. 6A

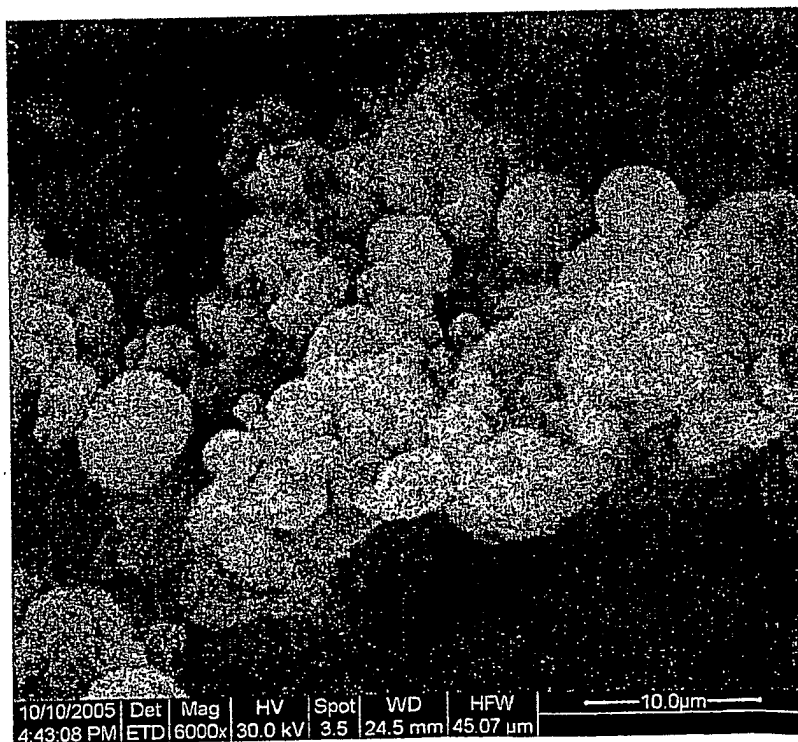


Fig. 6B

7/16

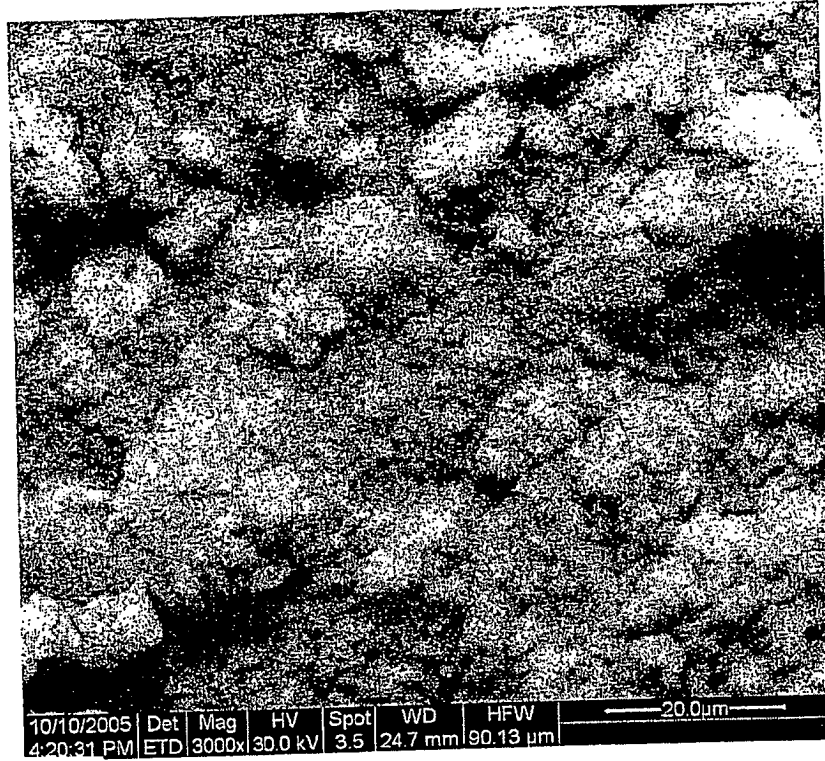


Fig. 7A

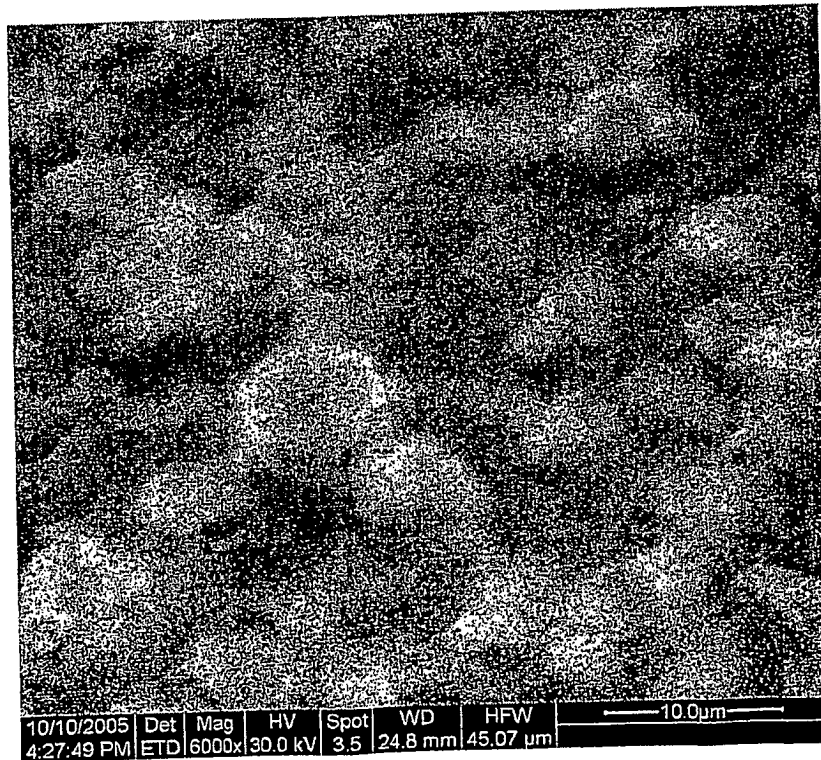


Fig. 7B



Fig. 8A

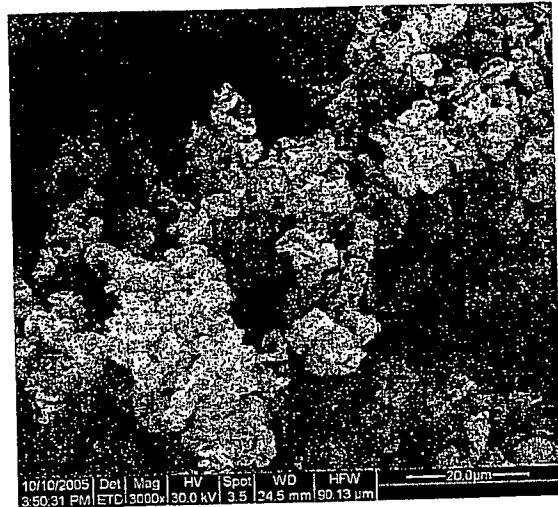


Fig. 8B



Fig. 8C



Fig. 8D

9/16



Fig. 9A

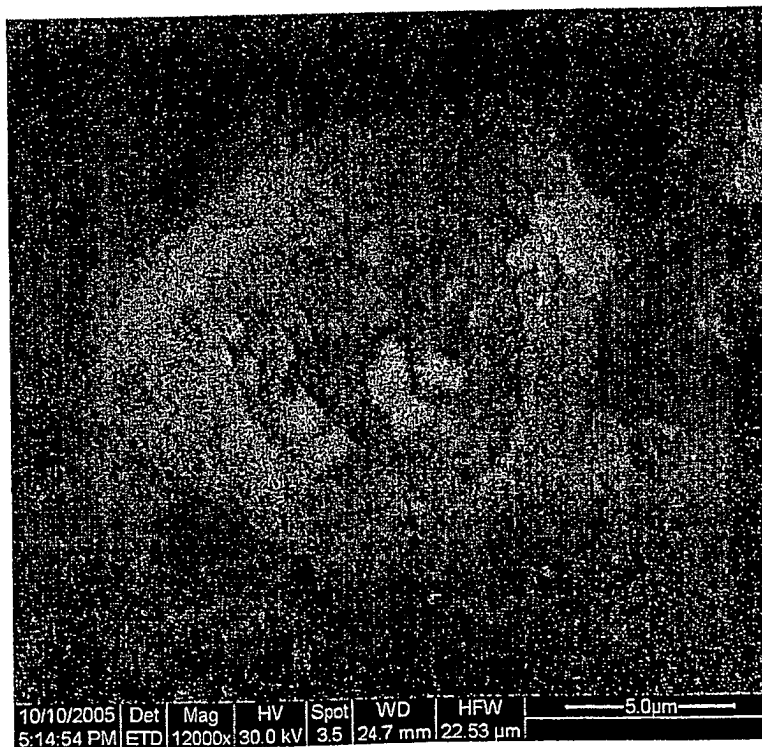


Fig. 9B

10/16

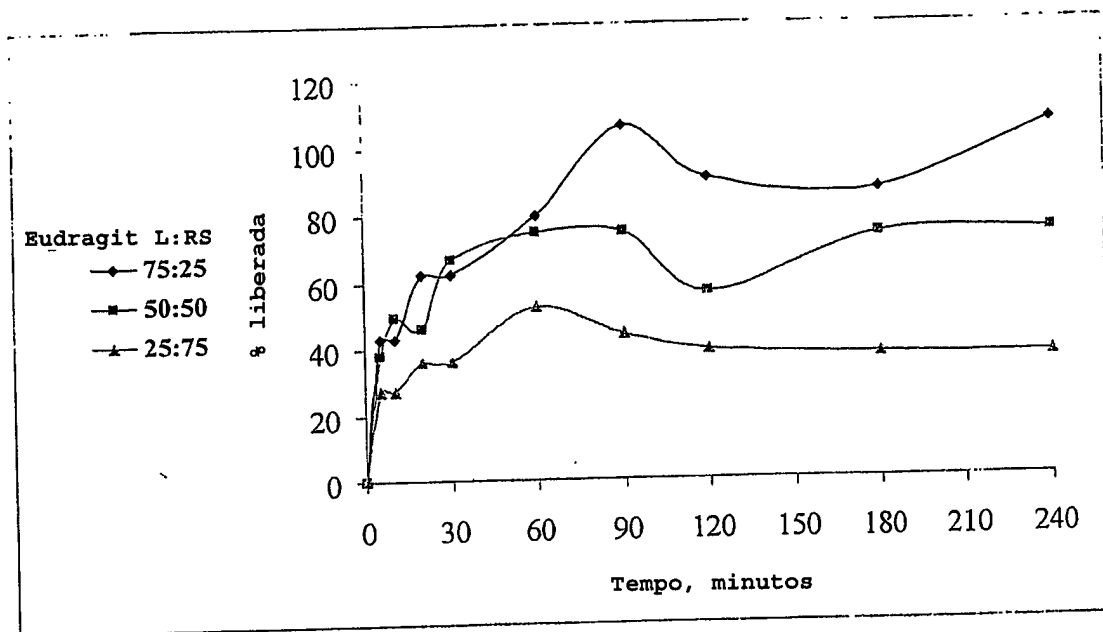


Fig. 10

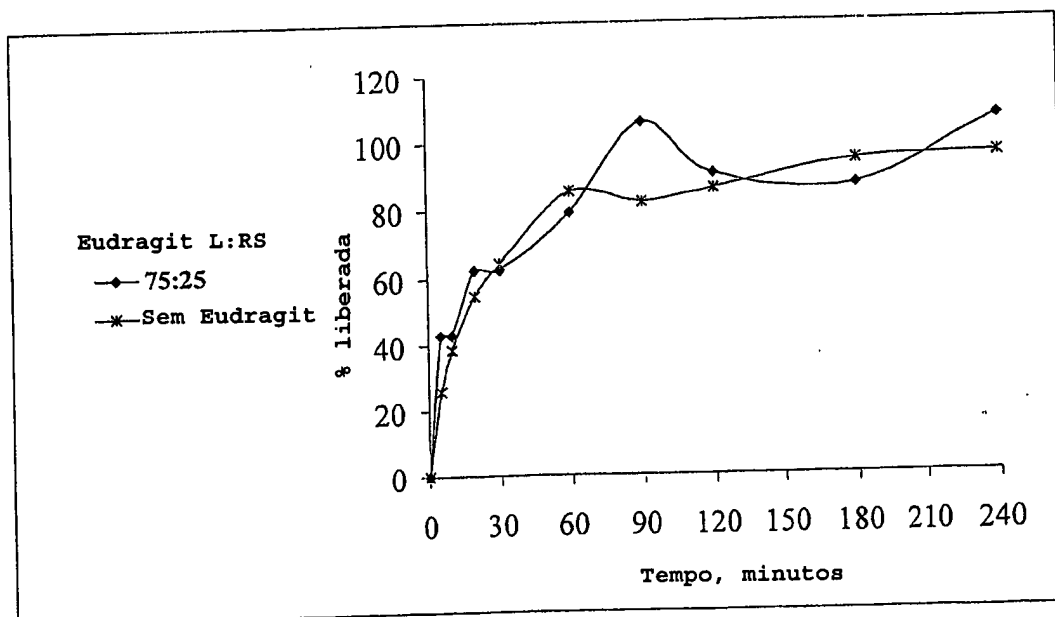


Fig. 11

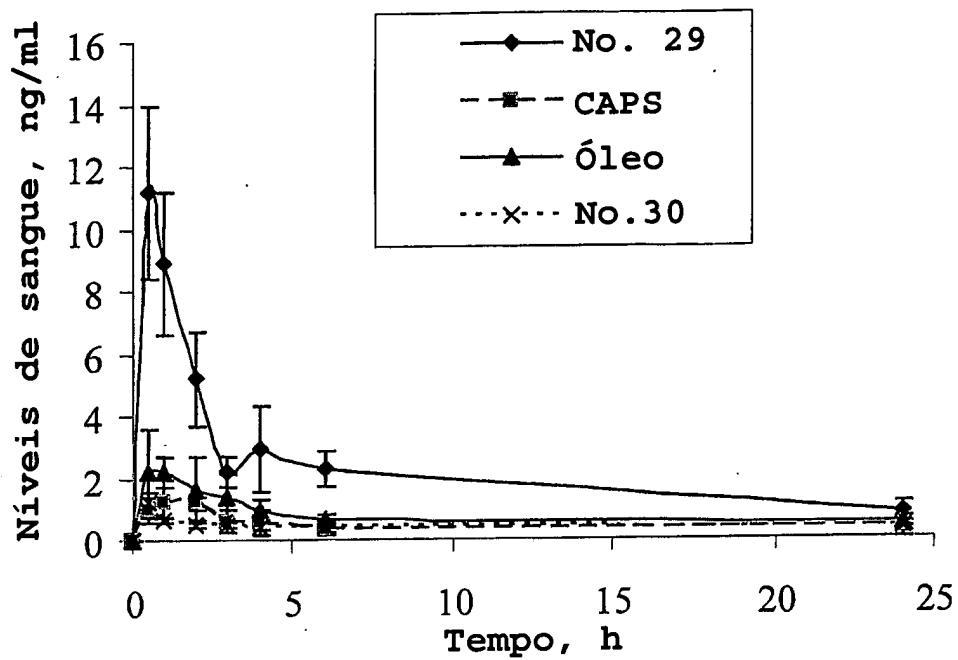


Fig. 12

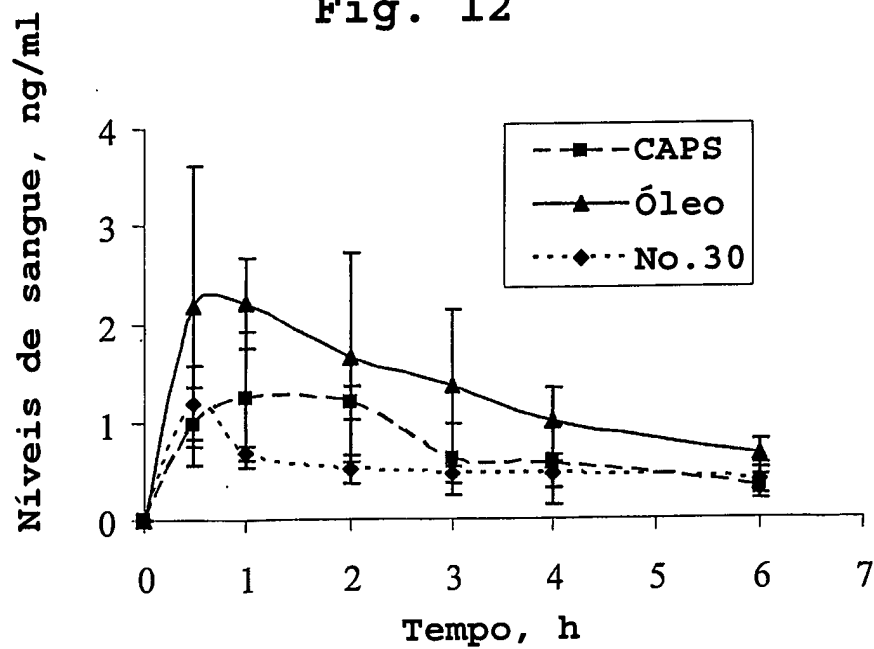


Fig. 13

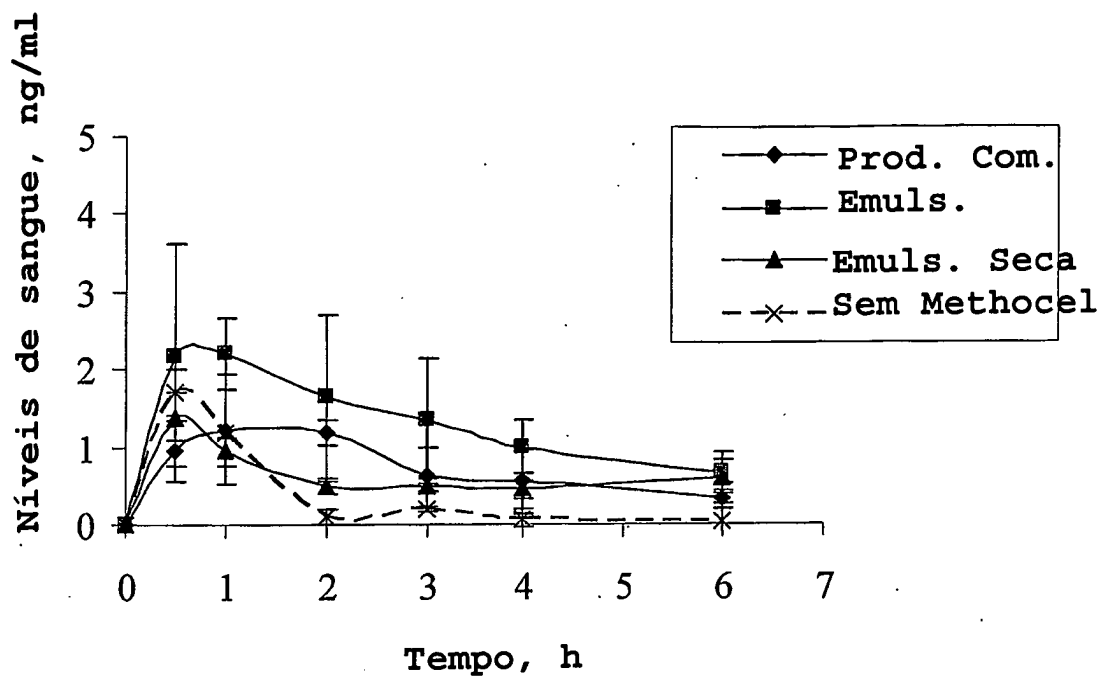


Fig. 14

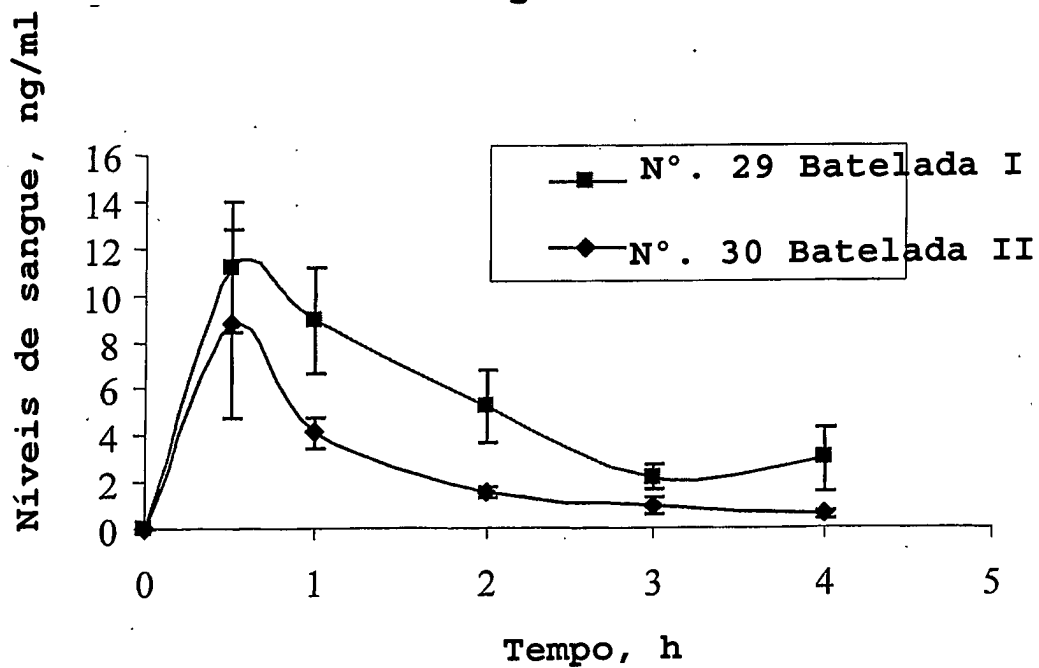


Fig. 15

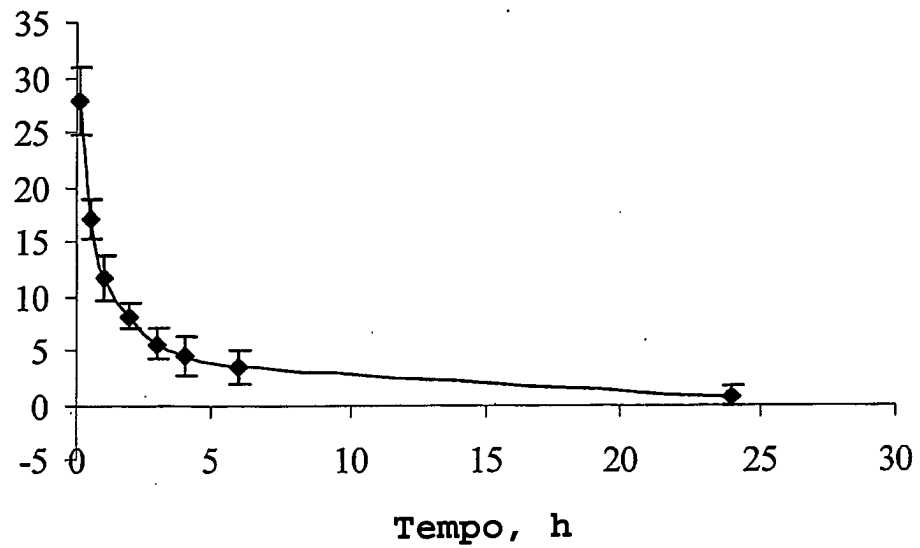


Fig. 16

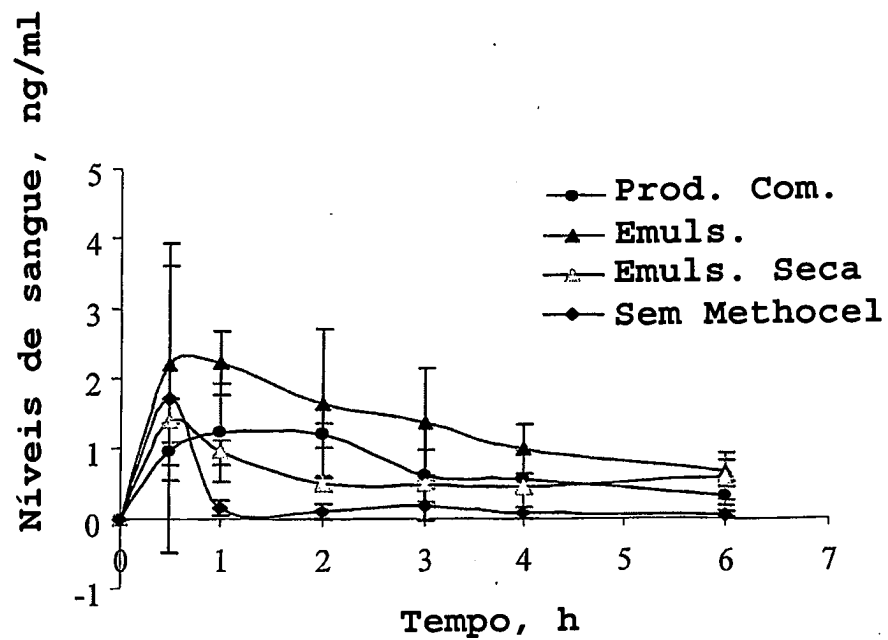


Fig. 17

14/16

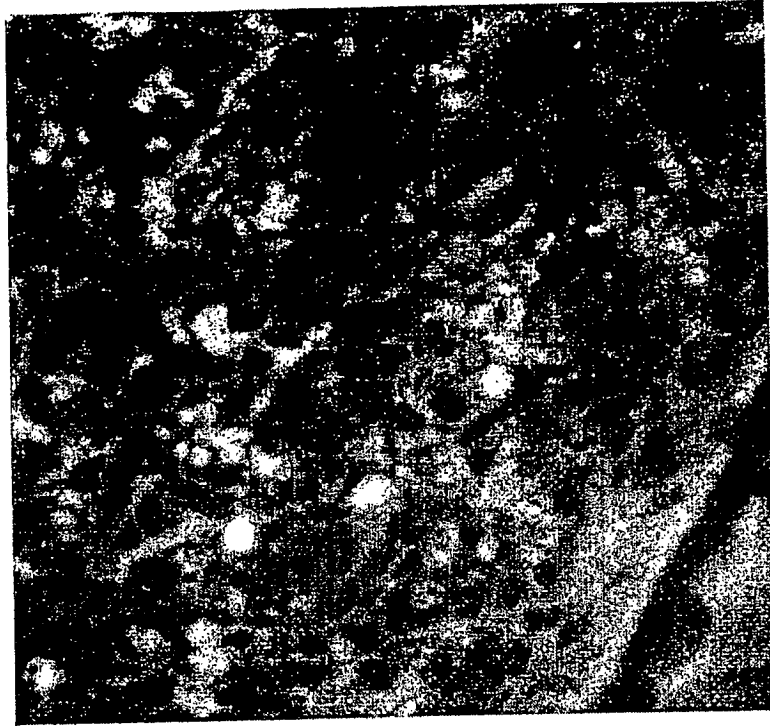


Fig. 18

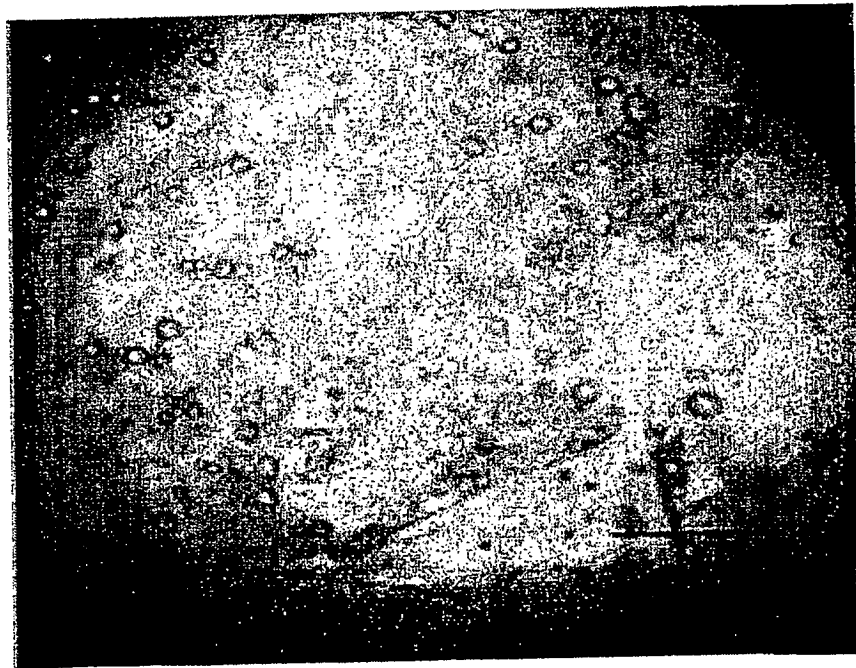


Fig. 19A

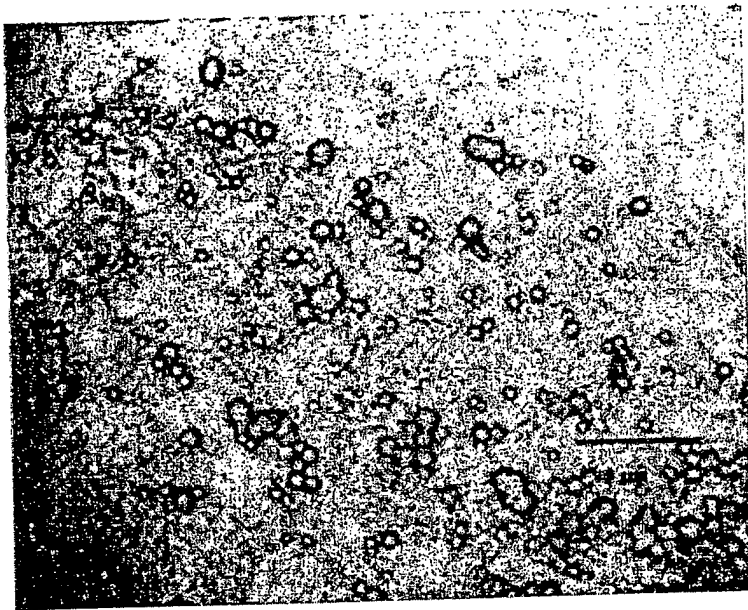


Fig. 19B

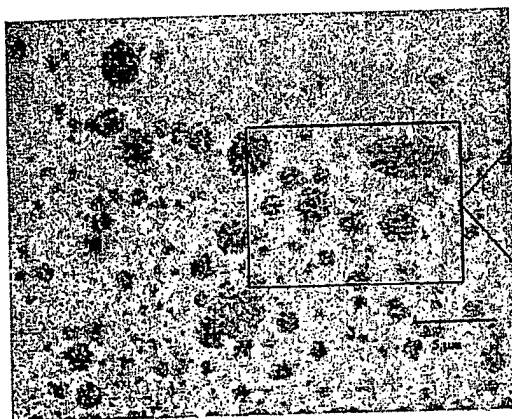


Fig. 19C

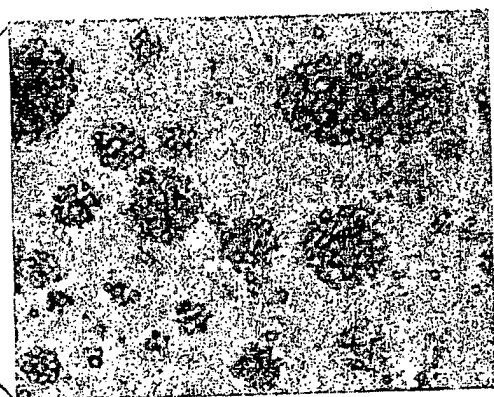


Fig. 19D

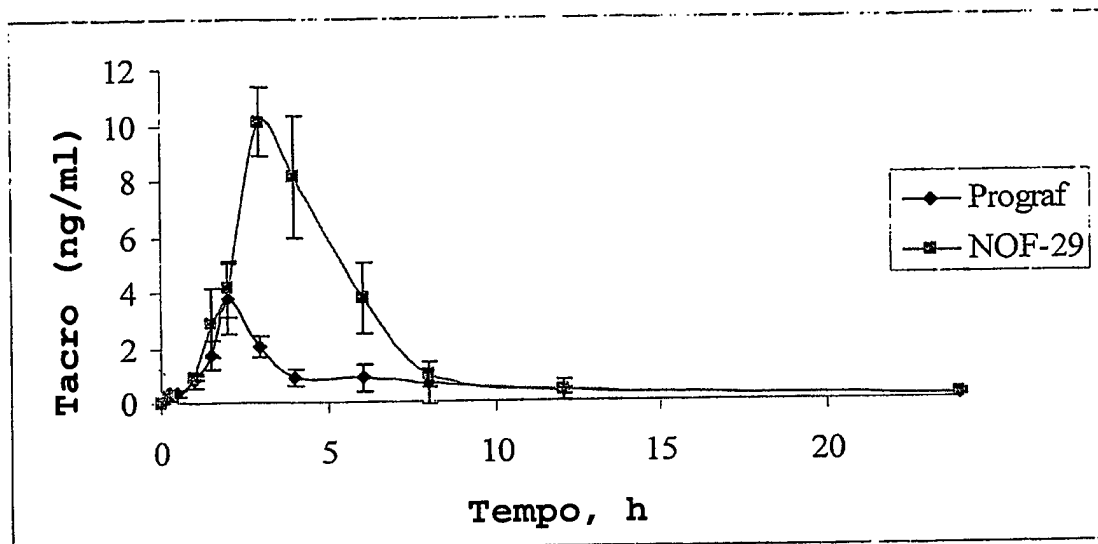


Fig. 20

RESUMO

MICROESFERAS, MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS QUE COMPREENDEM UMA PLURALIDADE DE NANOCÁPSULAS ACOMODADAS EM UM POLÍMERO FORMADOR DE GEL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO
5 PARA AUMENTAR A BIODISPONIBILIDADE DE UM AGENTE LIPOFÍLICO NO CORPO DE UM INDIVÍDUO HUMANO E MÉTODO DE TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO PARA UMA CONDIÇÃO PATOLÓGICA QUE REQUER UM NÍVEL EFICAZ AO SANGUE DE UM AGENTE ATIVO

A presente invenção apresenta microesferas que
10 compreendem uma pluralidade de nanocápsulas acomodadas em um polímero formador de gel, em que a pluralidade de nanocápsulas compreende um núcleo de óleo que contém um agente ativo não-hidrofílico e um envoltório de revestimento polimérico. A invenção também apresenta um método de
15 preparação das microesferas da invenção, composições farmacêuticas que compreendem a mesma, bem como métodos de uso das microesferas, especificamente em aplicações terapêuticas cosméticas e de diagnóstico.