



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112017010953-0 B1**

**(22) Data do Depósito:** 24/11/2015

**(45) Data de Concessão:** 16/01/2024

---

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO A COMBINAÇÃO DE UM LIPOSSOMA E UM CARREADOR QUE COMPREENDE UM COMPOSTO FARMACÊUTICO

**(51) Int.Cl.:** A61K 9/00; A61K 41/00; A61K 9/127; A61K 47/48.

**(30) Prioridade Unionista:** 25/11/2014 EP 14306875.7.

**(73) Titular(es):** CURADIGM SAS.

**(72) Inventor(es):** MATTHIEU GERMAIN; MARIE-EDITH MEYRE; AGNÈS POTTIER; LAURENT LEVY.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2015077425 de 24/11/2015

**(87) Publicação PCT:** WO 2016/083333 de 02/06/2016

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 24/05/2017

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende a combinação de (i) pelo menos uma nanopartícula biocompatível e de (ii) pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto farmacêutico, a ser administrada a um indivíduo que precisa de tal composto farmacêutico, em que a combinação da pelo menos uma nanopartícula biocompatível e do pelo menos um carreador que compreende o(s) composto(s) farmacêutico(s) potencializa a eficiência do(s) composto(s) de interesse. A dimensão mais longa da nanopartícula biocompatível está, tipicamente, entre cerca de 4 e cerca de 500 nm e seu valor de carga de superfície absoluto é de pelo menos 10 mV ( $\geq 10$  mV). O carreador é, além disso, desprovido de qualquer agente de estabilização de superfície estericamente. A invenção se refere também a tal composição para uso para administração do(s) composto(s) farmacêutico(s) a um indivíduo que precisa do(s) mesmo(s), em que pelo menos uma nanopartícula biocompatível e pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto farmacêutico devem ser administrados separadamente a um indivíduo que precisa do dito composto farmacêutico, tipicamente entre mais de 5 minutos e cerca de 72 horas um do outro.

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO A COMBINAÇÃO DE UM LIPOSSOMA E UM CARREADOR QUE COMPREENDE UM COMPOSTO FARMACÊUTICO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende a combinação de (i) pelo menos uma nanopartícula biocompatível e (ii) pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto de interesse, tipicamente pelo menos um composto farmacêutico, a ser administrada a um indivíduo que precisa de pelo menos um composto de interesse, em que a combinação da pelo menos uma nanopartícula biocompatível e do pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto de interesse potencializa a eficiência do(s) composto(s) de interesse. A dimensão mais longa da nanopartícula biocompatível está, tipicamente, entre cerca de 4 e cerca de 500 nm e seu valor de carga de superfície absoluta é de pelo menos 10 mV ( $|10 \text{ mV}|$ ). O carreador é desprovido de qualquer agente de estabilização de superfície estericamente.

[002] A invenção refere-se também a tal composição para uso para administração do(s) composto(s) de interesse a um indivíduo que precisa do mesmo, em que pelo menos uma nanopartícula por um lado e pelo menos um carreador que compreende o(s) composto(s) de interesse por outro lado devem ser, de preferência, administrados sequencialmente ao dito indivíduo, tipicamente entre mais de 5 minutos e cerca de 72 horas um do outro.

[003] A administração combinada e, tipicamente, sequencial ao indivíduo da pelo menos uma nanopartícula biocompatível e do pelo menos um carreador que compreende

o(s) composto(s) de interesse mantém o benefício farmacêutico (isto é, terapêutico, profilático ou de diagnóstico) do(s) dito(s) composto(s) de interesse para uma toxicidade reduzida dos mesmos no dito indivíduo ou aumenta seu benefício farmacêutico para uma toxicidade equivalente ou reduzida em comparação com o benefício farmacêutico e toxicidade induzida pelo(s) dito(s) composto(s) quando administrado(s) na dose farmacêutica padrão, tipicamente na ausência de qualquer nanopartícula e/ou carreador biocompatível.

[004] A composição farmacêutica da invenção permite, tipicamente, uma redução de pelo menos 10% da(s) dose(s) farmacêutica(s) administrada(s) em comparação com a(s) dose(s) farmacêutica(s) padrão do(s) dito(s) composto(s), tipicamente na ausência de qualquer nanopartícula biocompatível e/ou carreador, ao mesmo tempo em que mantém o mesmo benefício farmacêutico para uma toxicidade equivalente, de preferência uma toxicidade reduzida, para o indivíduo ou ao mesmo tempo em que aumenta o benefício farmacêutico para uma toxicidade reduzida ou equivalente para o indivíduo.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[005] O uso de nanotecnologias para distribuir agentes terapêuticos e de diagnóstico de forma mais segura e eficiente aos pacientes tem levado a um maior interesse no campo durante as últimas décadas. Surgiram sistemas de distribuição de fármacos, tipicamente carreadores, tais como lipossomas, emulsões ou micelas, que se destinam a maximizar a eficácia terapêutica de fármacos graças ao controle de seu perfil de biodistribuição. Estes sistemas oferecem a possibilidade de encapsular um fármaco pouco solúvel para

proteger um fármaco contra destruição ou eliminação e/ou modificar a circulação sanguínea e distribuição de um fármaco.

[006] A rápida depuração sanguínea observada da primeira geração de sistemas de distribuição de fármacos (DDSs) (em virtude de sua captura pelo sistema fagocítico mononuclear (MPS)) levou ao desenvolvimento de uma segunda geração de DDSs que exibem uma superfície modificada por agentes de estabilização estericamente selecionados para conferir propriedades de "ocultação" ao DDS quando ligados à sua superfície. Estes agentes são, tipicamente, polímeros flexíveis e/ou hidrofílicos, tais como polímeros de polietileno glicol (PEG) e, tipicamente, podem proporcionar cargas de superfície que são ligeiramente negativas ou positivas. A estabilização estérica impede a ligação não específica da superfície do DDS aos componentes sanguíneos e reduz sua rápida absorção e depuração *in vivo* pelas células do sistema fagocítico mononuclear (MPS), levando a tempos prolongados de circulação sanguínea do DDS [Jain K.R. e Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. Nature Reviews. Clinical Oncology 2010, 7, 653-664]. Os sistemas de distribuição de fármacos farmacêuticos em nanopartículas de longa circulação lipossômicas (NDDSs) são o tipo de NDDS mais frequentemente estudado; contudo, os polímeros anfifílicos sintéticos também têm sido usados para estabilizar estericamente outros tipos de NDDS para alterar sua biodistribuição [Torchilin V.P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. Nature Reviews. Drug Discovery 2014, 13, 813-827].

[007] Apesar deste tempo aumentado de

circulação sanguínea (isto é, transporte sanguíneo aprimorado), o qual se acredita ser benéfico para a distribuição do composto terapêutico ao seu local alvo, descobriu-se que o revestimento polimérico flexível e/ou hidrofílico, tipicamente o revestimento de PEG, compromete a distribuição intracelular do composto farmacêutico (isto é, a liberação do composto em seu local alvo) o que, por fim, resulta em perda de atividade para o sistema de distribuição. Uma forma de superar esta limitação é usar sistemas de PEG cliváveis. No entanto, a complexidade crescente na concepção de tais carreadores pode gerar dificuldades na reprodutibilidade das propriedades de superfície do carreador, resultando em variabilidade lote a lote inaceitável. Além disso, a extensão de exposição deste DDS "ocultos" foi relacionada a mais eventos adversos. Descobriu-se que O DOXIL, uma formulação lipossômica peguilada que compreende doxorubicina, por exemplo, produz efeitos adversos graves, tais como síndrome mão-pé ou mucosite. O revestimento hidrofílico dos lipossomas foi questionado como talvez facilitando seu acúmulo na glândula sudorípara écrina nas palmas das mãos e plantas dos pés [Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythro dysesthesia ('hand-foot' syndrome). D. Lorusso *et al.* *Annals of Oncology*. 2007; 18, 1159-1164].

[008] O documento WO2005/063305 se refere a um conjunto que compreende uma microvesícula cheia de gás (tipicamente com um tamanho de pelo menos 0,5  $\mu\text{m}$ ) e um componente (com um tamanho de cerca de menos de 100 nm) associado à dita microvesícula. O conjunto resultante deve ser usado como um componente farmacologicamente ativo em

formulações de diagnóstico e/ou terapêuticamente ativas. Os dois componentes, isto é, a microvesícula cheia de gás e o componente associado à microvesícula, são administrados simultaneamente, tipicamente para melhorar a formação de imagens no campo de imagiologia de contraste por ultrassom, incluindo imagiologia por ultrassom alvo, distribuição de fármaco mediada por ultrassom e outras técnicas de imagiologia.

[009] Conforme é evidente a partir do estado da técnica e apesar de uma necessidade médica prolongada, a distribuição segura e eficiente de compostos farmacêuticos (incluindo compostos terapêuticos, profiláticos, bem como de diagnóstico) ao(s) seu(s) local(is) alvo continua a ser uma preocupação. Há uma clara necessidade de melhorar a eficácia e segurança do composto, isto é, o transporte e liberação do composto farmacêutico, de modo que o dito composto alcance seu local alvo em um indivíduo na quantidade necessária e suficiente para obter o efeito diagnóstico, terapêutico ou profilático desejado.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[010] A presente invenção permite agora otimizar a eficiência de um composto de interesse (no presente documento também simplesmente identificado como "o composto") qualquer que seja seu uso pretendido no contexto de terapia, profilaxia ou diagnóstico. A composição descrita no presente documento, a qual é uma combinação de (i) pelo menos uma nanopartícula biocompatível e de (ii) pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto de interesse, otimiza os parâmetros farmacocinéticos do pelo menos um composto de interesse e, como uma consequência, torna agora

possível o desenvolvimento de compostos farmacêuticos os quais não poderiam, de outro modo, ter sido desenvolvidos em virtude, por exemplo, de sua toxicidade inaceitável. Tipicamente, a nanopartícula biocompatível não é usada como tal como um composto farmacêutico, isto é, como um composto terapêutico, profilático ou de diagnóstico.

[011] Uma composição típica da invenção (geralmente identificada no presente documento como "composição farmacêutica") é uma composição que compreende a combinação de (i) pelo menos uma nanopartícula biocompatível e (ii) pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto ("o composto de interesse"), em que a maior ou dimensão mais longa da nanopartícula biocompatível está, tipicamente, entre cerca de 4 nm e cerca de 500 nm e o valor de carga de superfície absoluta da nanopartícula biocompatível é de pelo menos 10 mV e em que o carreador é desprovido de qualquer agente de estabilização de superfície estericamente, isto é, desprovido de polímero flexível e/ou hidrofílico, de preferência desprovido de polímero hidrofílico com uma carga ligeiramente negativa ou positiva na superfície do carreador, tal como PEG.

[012] Tipicamente, a proporção entre as (pelo menos uma) nanopartículas biocompatíveis e os (pelo menos um) carreadores que compreendem pelo menos um composto de interesse está entre 0,1/1 e 1000/1 ou 0,5/1 e 1000/1, de preferência entre 0,5/1 e 500/1, ainda mais preferivelmente entre 0,5/1 e 300/1.

[013] Os termos "cerca de" e "em torno de", quando associados a um valor tal como, por exemplo, um tamanho de uma nanopartícula ou um intervalo de tempo,

indicam que uma variação no valor indicado, a qual seria reconhecida por aqueles versados na técnica como pequena variação, não tem um impacto substancial sobre as propriedades do objeto ao qual eles estão associados e que o dito objeto permanece no espírito da invenção reivindicada.

[014] Um objetivo preferido da invenção é uma composição farmacêutica que compreende a combinação de (i) pelo menos uma nanopartícula biocompatível e de (ii) pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto de interesse, tipicamente pelo menos um composto farmacêutico, em que a maior ou dimensão mais longa da nanopartícula biocompatível está entre cerca de 4 nm e cerca de 500 nm e o valor de carga de superfície absoluta da nanopartícula biocompatível é de pelo menos 10 mV ( $|10 \text{ mV}|$ ) e em que o carreador é desprovido de qualquer agente de estabilização de superfície estericamente, para uso para administração do pelo menos um composto de interesse a um indivíduo que precisa do mesmo, em que pelo menos uma nanopartícula biocompatível por um lado e pelo menos um carreador que compreende o pelo menos um composto de interesse por outro lado devem ser, de preferência, administrados separadamente a um indivíduo que precisa do dito pelo menos um composto de interesse, tipicamente entre mais de 5 minutos e cerca de 72 horas um do outro, e em que a nanopartícula biocompatível não é usada como tal como um composto farmacêutico.

[015] A administração combinada e, tipicamente, sequencial ao indivíduo da pelo menos uma nanopartícula biocompatível e do pelo menos um carreador que compreende o composto ou compostos de interesse, através da composição da invenção confere (mantém), tipicamente, o mesmo benefício

(isto é, terapêutico, profilático ou de diagnóstico) do(s) composto(s) para uma toxicidade reduzida do(s) mesmo(s) para o indivíduo ou aumenta o benefício farmacêutico do(s) composto(s) para uma toxicidade equivalente ou reduzida para o indivíduo (de preferência uma toxicidade reduzida) em comparação com o benefício farmacêutico e a toxicidade induzida pela dose farmacêutica padrão do(s) dito(s) composto(s), tipicamente na ausência de qualquer nanopartícula biocompatível e/ou carreador.

[016] A composição farmacêutica da invenção permite, tipicamente, uma redução de pelo menos 10%, de preferência pelo menos 15%, da(s) dose(s) de composto farmacêutico administrado (isto é, terapêutico, profilático ou de diagnóstico) em comparação com a(s) dose(s) farmacêutica(s) padrão do dito composto ou compostos, tipicamente na ausência de qualquer nanopartícula biocompatível e/ou carreador, (i) ao mesmo tempo em que mantém o mesmo benefício farmacêutico para uma toxicidade equivalente, de preferência uma toxicidade reduzida, para o indivíduo ou (ii) ao mesmo tempo em que aumenta o benefício farmacêutico para uma toxicidade equivalente ou reduzida para o indivíduo.

#### A NANOPARTÍCULA BIOCOMPATÍVEL

[017] Uma vez que o formato da partícula pode influenciar sua "biocompatibilidade", partículas com um formato bastante homogêneo são preferidas no presente documento. Por razões farmacocinéticas, nanopartículas essencialmente esféricas/redondas ou ovoides são, assim, preferidas. Tal formato também favorece a interação das nanopartículas com ou a absorção pelas células. O formato

esférico/redondo é particularmente preferido.

[018] No espírito da invenção, o termo "nanopartícula" se refere a um produto, em particular um produto sintético, com um tamanho na faixa de nanômetros, tipicamente entre cerca de 1 nm e cerca de 500 nm, de preferência entre cerca de 4 nm e cerca de 500 nm, entre cerca de 4 nm e cerca de 400 nm, cerca de 30 nm e cerca de 300 nm, cerca de 20 nm e cerca de 300 nm, cerca de 10 nm e cerca de 300 nm, por exemplo, entre cerca de 4 nm e cerca de 100 nm, por exemplo, entre cerca de 10 nm, 15 nm ou 20 nm e cerca de 100 nm ou entre cerca de 100 nm e cerca de 500 nm, tipicamente entre cerca de 100 nm e cerca de 300 nm.

[019] Os termos "tamanho da nanopartícula", "maior tamanho da nanopartícula" e "tamanho mais longo da nanopartícula" no presente documento se referem, tipicamente, à "maior ou dimensão mais longa da nanopartícula" ou "diâmetro da nanopartícula" quando de formato esférico/redondo ou ovoide. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) ou Cryo-TEM pode ser usada para medir o tamanho da nanopartícula. Além disso, Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) pode ser usada para medir o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em solução. Estes dois métodos podem ainda ser usados um após o outro para comparar o diâmetro hidrodinâmico de uma nanopartícula medido por DLS com o tamanho da dita nanopartícula medido por TEM ou Cryo-TEM para confirmar o dito tamanho. Um método preferido é DLS (Ref. International Standard ISO22412 Particle Size Analysis - Dynamic Light Scattering, International Organisation for Standardisation (ISO) 2008).

[020] Para ser utilizável no contexto da

invenção, a carga de superfície eletrostática absoluta (também identificada no presente documento como "carga" ou "carga de superfície") da nanopartícula biocompatível deve ser maior do que  $|10 \text{ mV}|$  (valor absoluto). A carga de superfície de uma nanopartícula é, tipicamente, determinada por medições do potencial zeta em meio aquoso para uma concentração de nanopartículas entre 0,2 e 10 g/L, para um pH entre 6 e 8 e, tipicamente, para concentrações de eletrólitos no meio aquoso entre 0,001 e 0,2 M, por exemplo, 0,01 M ou 0,15 M.

[021] Tipicamente, a nanopartícula biocompatível da presente invenção tem uma carga de superfície eletrônica de pelo menos 110 mV, isto é, abaixo de - 10 mV ou acima de + 10 mV, por exemplo, abaixo de entre - 12 mV ou - 15 mV e - 20 mV ou acima de entre + 12 mV ou + 15 mV e + 20 mV, tipicamente abaixo de - 15 mV ou acima de + 15 mV. De preferência, a nanopartícula biocompatível da presente invenção tem um valor de carga de superfície eletrônica absoluto ("valor de carga de superfície absoluta") acima de 10 mV, a dita carga sendo, ainda mais preferivelmente, uma carga negativa.

[022] As propriedades combinadas, tamanho e carga de superfície das nanopartículas permitem uma circulação sanguínea curta das nanopartículas e extravasamento no órgão do fígado. Portanto, ao administrar sequencialmente as nanopartículas biocompatíveis da invenção e o carreador que compreende o(s) composto(s) de interesse, nenhuma cocirculação ou cocirculação limitada dos dois compostos (isto é, da nanopartícula biocompatível e do carreador que compreende o(s) composto(s) de interesse) é

obtida. Portanto, as propriedades combinadas, o tamanho e a carga de superfície das nanopartículas biocompatíveis permitem o uso seguro do(s) composto(s) de interesse, ao mesmo tempo em que confere (mantém) o mesmo benefício farmacêutico (isto é, terapêutico, profilático ou de diagnóstico) para uma toxicidade reduzida do(s) mesmo(s) para o indivíduo, isto é, ao mesmo tempo em que aumenta o benefício farmacêutico do(s) composto(s) para uma toxicidade equivalente ou reduzida do(s) mesmo(s) para o indivíduo (de preferência uma toxicidade reduzida) em comparação com o benefício farmacêutico e a toxicidade induzida pela dose farmacêutica padrão do(s) dito(s) composto(s), tipicamente na ausência de qualquer nanopartícula e/ou carreador biocompatível.

[023] Contanto que ela seja carregada, a nanopartícula utilizável no contexto da invenção pode ser orgânica ou inorgânica. Uma mistura de nanopartículas orgânicas e inorgânicas pode ainda ser usada.

[024] Quando orgânica, a nanopartícula pode ser uma nanopartícula com base em lipídios (lipídios de glicerol, fosfolipídio, lipídio de esteroide, etc.), tal como uma nanopartícula de lipídio sólido, uma nanopartícula com base em proteína também identificada no presente documento como "nanopartícula de proteína" (albumina, por exemplo), uma nanopartícula com base em polímero ("nanopartícula polimérica"), uma nanopartícula de copolímero ("nanopartícula copolimérica"), uma nanopartícula com base em carbono, uma nanopartícula de tipo vírus (por exemplo, um vetor viral).

[025] A nanopartícula orgânica pode ainda ser uma nanoesfera (nanopartícula simples) ou uma nanocápsula

(nanopartícula oca), tal como um lipossoma, um gel, um hidrogel, uma micela, um dendrímero, etc. Uma mistura das nanopartículas orgânicas descritas no presente documento também pode ser usada. O polímero ou copolímero pode ser de origem natural ou sintética.

[026] Exemplos de polímeros ou copolímeros sintéticos (artificiais) e naturais utilizáveis no contexto da invenção para preparar nanopartículas orgânicas podem ser selecionados a partir de ácido poliláctico (PLA), ácido poli(lactida-co-glicólico) (PLGA), polietileno glicol (PEG), poligalactina, polilactida, ésteres de polioxietileno de ácidos graxos, polipropileno glicol, polissorbato, álcool (poli)vinílico, poliacrilamida, polimetilmetacrilato, polialquilcianoacrilato, Polilactato-co-glicolato, Poli(amido amina), Poli(etilenoimina), alginato, celulose e polímeros derivados de celulose, colágeno, ácido hialurônico, ácido poliglutâmico (PGA), actina, polissacarídeo e gelatina.

[027] Quando inorgânica e quando sua dimensão mais longa está, tipicamente, abaixo de cerca de 10 nm, por exemplo, abaixo de cerca de 8 nm, abaixo de cerca de 7 nm, tipicamente compreendida entre cerca de 7 nm e cerca de 4 nm, por exemplo, abaixo de cerca de 6 nm, abaixo de cerca de 5 nm ou abaixo de cerca de 4 nm, a nanopartícula pode ser feita de qualquer material inorgânico. O material inorgânico pode compreender, por exemplo, um elemento metálico do período 3, 4, 5, 6 da Tabela Periódica de Mendeleev, incluindo os lantanídeos. Quando a dimensão mais longa da nanopartícula está, tipicamente, abaixo de cerca de 10 nm, as nanopartículas podem ser montadas em estruturas maiores. A montagem de nanopartículas em uma estrutura maior pode,

tipicamente, ser desencadeada por interação entre as nanopartículas e (um) polímero(s) biocompatível(is), proteína(s), etc. Também podem ser obtidas estruturas maiores através de captura das nanopartículas em um carreador, tipicamente um carreador simples, tal como uma estrutura de gelatina (também identificada no presente documento como "nanopartícula de gelatina") ou um carreador oco, tal como um lipossoma. Após administração *in vivo*, aquelas estruturas maiores podem ainda ser concebidas por aqueles versados na técnica para liberar as nanopartículas.

[028] Quando inorgânica e quando a dimensão mais longa da dita nanopartícula é, tipicamente, de pelo menos 10 nm, tipicamente entre 10 e 500 nm, a nanopartícula pode compreender pelo menos um de, ou pode consistir em (i) um ou mais elementos metálicos divalentes selecionados, por exemplo, a partir de Mg, Ca, Ba e Sr, (ii) um ou mais elementos metálicos trivalentes selecionados, por exemplo, a partir de Fe e Al e (iii) um ou mais elementos metálicos tetravalentes que compreendem Si.

[029] Em uma modalidade particular, o material inorgânico da nanopartícula é selecionado a partir de (i) um ou mais elementos metálicos divalentes selecionados, por exemplo, a partir de Mg, Ca, Ba e Sr (ii) um ou mais elementos metálicos trivalentes selecionados, por exemplo, a partir de Fe e Al e (iii) um ou mais elementos metálicos tetravalentes que compreendem Si.

[030] Em uma outra modalidade particular, o material inorgânico da nanopartícula é selecionado a partir de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), carbonato de magnésio ( $\text{MgCO}_3$ ), hidróxido de magnésio ( $\text{Mg(OH)}_2$ ), hidróxido de ferro

(Fe(OH)<sub>2</sub>), oxi-hidróxido de ferro (FeOOH), óxido de ferro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ou Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>),, óxido de alumínio (Al<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>), oxi-hidróxido de alumínio (AlOOH) e óxido de silício (SiO<sub>2</sub>).

[031] As nanopartículas usadas nas composições descritas no presente documento são biocompatíveis, isto é, compatíveis com tecidos vivos. Quando requerido por sua composição, as nanopartículas devem ser, assim, revestidas com um material biocompatível para se tornarem utilizáveis. Em uma modalidade particular da invenção, a nanopartícula mencionada no presente documento é, assim, coberta com um revestimento biocompatível.

[032] O material biocompatível pode ser um agente que permita a interação com um alvo biológico. Esse agente trará, tipicamente, uma carga positiva ou negativa sobre a superfície da nanopartícula quando a carga absoluta da nanopartícula é de pelo menos 10 mV.

[033] Um agente que forma uma carga positiva sobre a superfície da nanopartícula pode ser, por exemplo, selecionado a partir de aminopropiltriétoxissilano ou polilisina. Um agente que forma uma carga negativa sobre a superfície da nanopartícula pode ser, por exemplo, selecionado a partir de um fosfato (por exemplo, um polifosfato, um metafosfato, um pirofosfato, etc.), um carboxilato (por exemplo, citrato ou ácido dicarboxílico, em particular ácido succínico) e um sulfato.

[034] Em uma modalidade particular, contanto que a carga absoluta da nanopartícula seja de pelo menos 10 mV (|10 mV|), a nanopartícula pode ser revestida com um material biocompatível que compreende um agente que exhibe um

grupo estérico, tal agente também identificado no presente documento como um "agente de estabilização de superfície estericamente".

[035] Tal agente que exhibe um grupo estérico pode ser selecionado, por exemplo, a partir de polietileno glicol (PEG); óxido de polietileno; álcool polivinílico; poliacrilato; poliacrilamida (poli(N-isopropilacrilamida)); poliacetamida; um biopolímero; um polissacarídeo, tal como dextrana, xilana e celulose; colágeno; um composto Zwitteriônico, tal como polissulfobetaina; etc.

[036] O revestimento biocompatível pode, vantajosamente, ser um "revestimento completo" (monocamada completa).

[037] Isto implica a presença de uma densidade muito alta de moléculas biocompatíveis, criando uma carga apropriada sobre toda a superfície da nanopartícula.

[038] O revestimento biocompatível pode compreender ainda um agente de marcação, tipicamente um agente que permita a visualização de uma cor usando equipamento de imagiologia padrão.

[039] A administração combinada da pelo menos uma nanopartícula biocompatível juntamente com pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto de interesse mantém o benefício farmacêutico (isto é, terapêutico, profilático ou de diagnóstico), tipicamente terapêutico, do(s) composto(s) de interesse para uma toxicidade reduzida ou aumenta o benefício farmacêutico do(s) composto(s) de interesse para uma toxicidade equivalente ou reduzida, para o indivíduo, tipicamente quando administrada ao indivíduo que precisa do(s) composto(s) de interesse entre mais de 5

minutos e cerca de 72 horas um do outro em comparação com o benefício farmacêutico e a toxicidade induzida pela(s) dose(s) farmacêutica(s) padrão, tipicamente terapêutica(s), do(s) dito(s) composto(s), tipicamente na ausência de qualquer nanopartícula biocompatível e/ou carreador.

[040] Em uma modalidade particular, a administração combinada da pelo menos uma nanopartícula biocompatível e do pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto de interesse permite uma redução de pelo menos 10%, de preferência pelo menos 15%, do(s) composto(s) administrado(s), tipicamente quando administrada ao indivíduo que precisa do pelo menos um composto de interesse, entre mais de 5 minutos e cerca de 72 horas um do outro em comparação com a(s) dose(s) terapêutica(s) padrão do(s) dito(s) composto(s), tipicamente na ausência de qualquer nanopartícula biocompatível e/ou carreador, ao mesmo tempo em que mantém mesmo benefício terapêutico para uma toxicidade equivalente ou uma toxicidade reduzida (de preferência uma toxicidade reduzida) do(s) composto(s) para o indivíduo; ou ao mesmo tempo em que aumenta o benefício terapêutico para uma toxicidade equivalente ou reduzida do(s) composto(s) para o indivíduo. Em uma modalidade particular, a pelo menos uma nanopartícula é administrada com vários carreadores, tipicamente pelo menos dois carreadores, cada um dos quais compreendendo pelo menos um composto de interesse. Os compostos de interesse presentes em um primeiro carreador podem ser idênticos ou diferentes daqueles presentes em um segundo ou em outro carreador distinto.

[041] A nanopartícula é, de preferência, eliminada do indivíduo ao qual ela foi administrada

tipicamente dentro de 1 hora e 6 semanas, por exemplo, 1 mês (4 semanas), dentro de 1 hora e 1 mês, por exemplo, entre 1 hora e 3 semanas ou entre 1 hora e 2 semanas ou entre 1 hora e 1 semana após sua administração a um indivíduo que precisa do composto de interesse.

[042] O material que constitui a nanopartícula (incluindo seu revestimento biocompatível quando presente) é importante para determinar a biopersistência (isto é, a persistência no indivíduo) da nanopartícula. A nanopartícula pode ser considerada biodegradável (quando constituída, por exemplo, de um polímero biodegradável, tal como PLGA ou PLA) e/ou solúvel (óxido de ferro, por exemplo) ou não biodegradável e insolúvel. As nanopartículas biodegradáveis e solúveis são eliminadas mais rapidamente do indivíduo do que as nanopartículas não biodegradáveis e/ou insolúveis.

#### O COMPOSTO DE INTERESSE

[043] Diferentes moléculas ou agentes podem ser usados, de acordo com o presente ensinamento, como o pelo menos um composto de interesse, tipicamente como pelo menos um composto farmacêutico de interesse. Este composto pode ser um composto terapêutico, profilático ou de diagnóstico, conforme explicado anteriormente. Ele pode ser um composto orgânico ou um composto inorgânico.

[044] Exemplos de compostos utilizáveis como o "composto de interesse" são, tipicamente, selecionados a partir de uma pequena molécula, um composto citotóxico e um complexo de coordenação de metal de transição.

[045] No contexto da presente invenção, uma pequena molécula é um composto orgânico com um baixo peso molecular (< 900 daltons) com um tamanho da ordem de  $10^{-9}$  m.

A maioria dos fármacos é pequenas moléculas.

[046] Em uma modalidade particular, o composto de interesse usado no contexto da presente invenção é uma pequena molécula alvo. Uma pequena molécula alvo geralmente inibe os domínios enzimáticos em proteínas com mutação, excessivamente expressas ou de outro modo críticas (alvos potenciais no contexto do tratamento de câncer) dentro das células malignas. As pequenas moléculas alvo incluem moléculas que têm como alvo a divisão celular (por exemplo, um inibidor de quinase aurora ou um inibidor de quinase dependente de ciclina) ou outro mecanismo biológico, tal como renovação de proteínas ou modificação de cromatina (por exemplo, um inibidor de histona desacetilase). Exemplos de pequenas moléculas alvo são imatinibe, rapamicina, gefitinibe, erlotinibe, sorafenibe, sunitinibe, nilotinibe, dasatinibe, lapatinibe, bortezomibe, atorvastatina, etc.

[047] Em outra modalidade particular, o composto de interesse usado no contexto da presente invenção é um composto citotóxico, por exemplo, um agente quimioterápico. O composto citotóxico pode ser, por exemplo, selecionado a partir de um agente modificador de DNA, tal como uma antraciclina (por exemplo, doxorubicina, daunorrubicina, etc.); um agente alquilante (por exemplo, melfalano ou temozolomida); e um fármaco que interfere muito precisamente com mecanismos fisiológicos definidos, tais como polimerização de microtúbulos (por exemplo, taxol) ou síntese de metabólitos (por exemplo, metotrexato). Em uma modalidade particular, o composto citotóxico é um composto citotóxico ativável. A fotofrina é um exemplo de tal composto citotóxico ativável, tipicamente usado no contexto de Terapia

Fotodinâmica. A fotofrina é ativada por uma fonte de laser para produzir seu efeito terapêutico.

[048] Em outra modalidade particular, o composto de interesse usado no contexto da presente invenção é um complexo de coordenação de metal de transição. Os complexos de coordenação de metal de transição oferecem vantagens potenciais em relação aos fármacos orgânicos mais comuns, incluindo uma grande variedade de números e geometrias de coordenação, estados redox acessíveis, 'capacidade de sintonia' da termodinâmica e cinética de substituição de ligante, bem como uma ampla diversidade estrutural. As substâncias com base em metais interagem com alvos moleculares celulares, afetando as funções bioquímicas, resultando em destruição de células malignas. Os complexos de coordenação de metal de transição são, tipicamente, agentes citotóxicos (por exemplo, complexos de coordenação de platina: cisplatina, carboplatina, oxaloplatina ou complexos de coordenação de rutênio ou ouro) que atuam sobre estruturas de DNA.

#### O CARREADOR

[049] O pelo menos um composto de interesse é encapsulado ou impregnado em um carreador ou enxertado (ligado) a tal carreador de acordo com métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Representações esquemáticas de carreadores que compreendem pelo menos (um) composto(s) de interesse são apresentadas na Figura 1.

[050] O carreador pode ser um carreador orgânico. O carreador orgânico é, tipicamente, selecionado a partir de um carreador lipídico (por exemplo, um glicerolipídio, um fosfolipídio, um esterol, etc.); um

carreador polimérico; um carreador copolimérico; um carreador e carbono; e um carreador de tipo vírus (por exemplo, um vetor viral).

[051] O polímero ou copolímero que constitui o carreador pode ser de origem natural ou sintética.

[052] Exemplos de polímeros ou copolímeros sintéticos (artificiais) e naturais utilizáveis no contexto da invenção para preparar o carreador podem ser selecionados a partir de ácido poliláctico (PLA), ácido poli(lactídeo-co-glicólico) (PLGA), ácido poli (glutâmico) (PGA), poli(caprolactona) (PCL), poli (aminoácidos), poligalactina, polilactida, ésteres de ácidos graxos de polioxietileno, polissorbato, álcool polivinílico, poli(acrilamida), polimetilmetacrilato, polialquilmecianoacrilato, polilactato-co-glicolato, poli (amido amina), polímeros de poli (etilenoimina), alginato, celulose e derivados de celulose, colágeno, ácido hialurônico, actina, polissacarídeo e gelatina.

[053] O carreador pode ser um carreador inorgânico. O carreador inorgânico é, tipicamente, uma nanopartícula. A nanopartícula é, tipicamente, selecionada a partir de uma nanopartícula metálica, uma nanopartícula de óxido metálico e uma mistura das mesmas.

[054] O carreador pode ser um carreador simples, tal como uma nanoesfera (nanopartícula simples) ou um carreador oco, tal como uma nanocápsula (nanopartícula oca).

[055] Os carreadores preferidos são, por exemplo, selecionados a partir de um lipossoma, uma micela, um carreador polimérico (ou "polímero"), um hidrogel, um

dendrímero, um gel, um carreador copolimérico, um carreador de proteína e um carreador inorgânico, conforme definido no presente documento.

[056] A superfície do carreador da presente invenção é, tipicamente e de preferência, desprovida de (ou, em outras palavras, carece ou não expõe) qualquer agente de estabilização de superfície estericamente, isto é, qualquer polímero hidrofílico e/ou flexível. Por exemplo, o carreador da presente invenção é desprovido de, ou não expõe, um polímero selecionado a partir de dextrana, ácido polissialílico (PSA), ácido hialurônico, quitosana, heparina, polivinilpirrolidona (PVP), álcool polivinílico (PVA), poli(acrilamida), poli (etileno glicol) (PEG) e um copolímero com base em PEG, tal como poloxâmero, poloxamina ou polissorbato. De preferência, o carreador da invenção é desprovido de qualquer polímero hidrofílico que traga uma carga de superfície ligeiramente negativa ou positiva à superfície do carreador, tal como poli (etileno glicol) (PEG) ou copolímero com base em PEG, álcool polivinílico (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP).

[057] A composição farmacêutica da presente invenção (cf. Figura 2b) pode, vantajosamente, ser substituída por carreadores existentes (ou sistemas de distribuição de fármaco) que compreendem ou expõem um agente de estabilização de superfície estericamente (Figura 2a) tal como, tipicamente, um polímero hidrofílico e flexível, mais particularmente um polímero hidrofílico o qual traz uma carga de superfície ligeiramente positiva ou negativa para a superfície do carreador (por exemplo, um polímero de polietileno glicol), tal superfície negativa ou positiva

carregada sendo considerada neutra por aqueles versados na técnica.

[058] A composição farmacêutica da presente invenção mantém o benefício farmacêutico (isto é, terapêutico, profilático ou de diagnóstico) do composto de interesse para uma toxicidade reduzida do mesmo no dito indivíduo ou aumenta seu benefício farmacêutico para uma toxicidade equivalente ou reduzida em comparação com o benefício farmacêutico e toxicidade induzida pelo dito composto quando administrado na dose farmacêutica padrão, tipicamente na ausência de qualquer nanopartícula e/ou carreador.

[059] A composição farmacêutica da presente invenção permite, em geral, uma redução de pelo menos 10% da dose farmacêutica do composto administrado em comparação com a dose farmacêutica padrão do dito composto, tipicamente na ausência de qualquer nanopartícula e/ou carreador, ao mesmo tempo em que mantém o mesmo benefício farmacêutico para uma toxicidade equivalente, de preferência uma toxicidade reduzida, para o indivíduo ou aumenta o benefício farmacêutico para uma toxicidade reduzida ou equivalente para o indivíduo.

[060] O carreador permite que a liberação do composto de interesse, de preferência de uma forma controlada. O carreador pode, tipicamente, ser manipulado para liberar o(s) composto(s) de interesse em uma taxa predeterminada ou sintonizável ou em resposta a um estímulo externo.

[061] Em uma modalidade particular, o carreador permite a liberação do(s) composto(s) de interesse,

tipicamente por meio de liberação temporal controlada, por meio de difusão do composto de interesse a partir do carreador, através de erosão e/ou através de degradação do carreador.

[062] Em outra modalidade particular, o carreador permite a liberação do(s) composto(s) de interesse graças a uma ativação intracelular ou extracelular, isto é, em resposta a um estímulo intracelular ou extracelular, tal como uma variação do pH ou a ação de uma enzima. Em outra modalidade particular, o carreador permite a liberação do(s) composto(s) de interesse em resposta a um estímulo externo. Exemplos de estímulos externos são radiações eletromagnéticas (por exemplo, uma radiação ionizante, tal como raios X, raios gama, ou uma radiação não ionizante, tal como raios UV, luz visível ou infravermelho), ultrassons e um campo magnético. O composto farmacêutico é liberado, por exemplo, a partir do carreador quando o dito carreador é exposto a um estímulo externo selecionado a partir de radiações eletromagnéticas, ultrassons e um campo magnético.

[063] Um carreador desprovido de qualquer agente de estabilização de superfície estericamente pode ser, por exemplo, um lipossoma com uma temperatura de transição de fase membrana compreendida entre 37°C e 45°C que compreende dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) a 62% molar, fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) a 22% molar e colesterol (Chol) a 16% molar ou dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) a 90% molar e monopalmitoilfosfatidilcolina (CPMP) a 10% molar.

[064] Um carreador desprovido de qualquer agente de estabilização de superfície estericamente também

pode ser, por exemplo, um lipossoma que compreende um fosfolipídio sintético, tal como 1,3-diamidofosfolipídio sensível à tensão de cisalhamento.

[065] Um carreador desprovido de qualquer agente de estabilização de superfície estericamente também pode ser, por exemplo, um lipossoma que compreende um peptídeo o qual muda sua conformação (alfa-hélice de beta-folha) quando de estímulos de pH ou temperatura.

[066] Um carreador desprovido de qualquer agente de estabilização de superfície estericamente também pode ser, por exemplo, um lipossoma anfotérico que compreende 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) em uma proporção molar de 3:1 e uma quantidade igual de um anfifilo catiônico fraco e um anfifilo aniônico fraco, ambos derivados a partir de colesterol, N-(3'-O-colesteriloxycarbonil)-5-(N-etil-morfolina)-succinamida (MoChol) e colesteril-hemissuccinato (CHEMS).

[067] A composição farmacêutica da invenção (definida pela combinação de pelo menos uma nanopartícula biocompatível e o pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto de interesse) pode ser usada em muitos campos, em particular em medicina humana ou veterinária. Esta composição é, tipicamente, para uso em um animal, de preferência em um mamífero, ainda mais preferivelmente um ser humano, independentemente de sua idade ou sexo.

[068] A composição farmacêutica da invenção pode ser usada para prevenir ou tratar uma doença ou transtorno selecionado a partir de uma doença cardiovascular, uma doença do sistema nervoso central (SNC), uma doença

gastrintestinal, um transtorno genético, uma doença hematológica, um transtorno hormonal, um transtorno imune, uma doença infecciosa, um transtorno metabólico, um transtorno musculoesquelético, um câncer, uma doença respiratória e uma intoxicação, etc. Em uma modalidade preferida, a composição farmacêutica deve ser usada para prevenir ou tratar uma doença ou transtorno selecionado a partir de uma doença cardiovascular, uma doença do SNC, um câncer, uma doença infecciosa e um transtorno metabólico.

[069] No contexto da presente invenção, a pelo menos uma nanopartícula e o pelo menos um carreador que compreende o(s) composto(s) de interesse devem, vantajosamente, ser administrados a um indivíduo que precisa do(s) dito(s) composto(s) de interesse entre mais de 5 minutos e cerca de 72 horas um do outro, tipicamente entre mais de 5 minutos e cerca de 24 horas, de preferência entre mais de 5 minutos ou 30 minutos e cerca de 12 horas, de modo a otimizar a eficácia do(s) composto(s) farmacêutico(s).

[070] Na presente invenção, quando a pelo menos uma nanopartícula e o pelo menos um carreador que compreende o(s) composto(s) de interesse devem, vantajosamente, ser administrados a um indivíduo que precisa do dito composto entre mais de 5 minutos e cerca de 72 horas um do outro, o valor da carga de superfície absoluto da pelo menos uma nanopartícula biocompatível é de pelo menos 10 mV ( $|10 \text{ mV}|$ ).

[071] Em uma modalidade particular da presente invenção, quando a pelo menos uma nanopartícula e o pelo menos um carreador que compreende o(s) composto(s) de interesse devem, vantajosamente, ser administrados a um indivíduo que precisa do dito composto entre mais de 5

minutos e cerca de 24 horas um do outro, o valor da carga de superfície absoluto da pelo menos uma nanopartícula biocompatível é, vantajosamente, de pelo menos 15 mV (|15 mV|).

[072] Em outra modalidade particular da presente invenção, quando a pelo menos uma nanopartícula e o pelo menos um carreador que compreende o(s) composto(s) de interesse devem, vantajosamente, ser administrados a um indivíduo que precisa do dito composto entre mais de 5 minutos e cerca de 24 horas um do outro, o valor da carga de superfície absoluto da pelo menos uma nanopartícula biocompatível é, vantajosamente, de pelo menos 20 mV (|20 mV|).

[073] Também é descrito no presente documento um método de prevenção ou tratamento de um indivíduo suspeito de estar predisposto a uma doença, ou que está sofrendo de uma doença, tal como aquelas mencionadas no presente documento, em que o dito método compreende administração, ao dito indivíduo, de uma composição farmacêutica da invenção, tipicamente pelo menos uma nanopartícula biocompatível e pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto de interesse, conforme descrito no presente documento. Qualquer um da pelo menos uma nanopartícula ou pelo menos um carreador que compreende o(s) composto(s) de interesse pode ser administrado primeiro ao indivíduo, contanto que a pelo menos uma nanopartícula biocompatível e o pelo menos um carreador que compreende o(s) composto(s) sejam administrados separadamente, tipicamente em um intervalo de entre mais de 5 minutos e cerca de 72 horas. A administração da dita pelo menos uma nanopartícula ou pelo menos um carreador que

compreende composto(s) de interesse pode ser uma única administração de cada um, administrações repetidas de cada um, por exemplo, várias administrações consecutivas de cada um. A nanopartícula biocompatível pode ser administrada de uma vez e o pelo menos um carreador que compreende composto(s) de interesse pode ser administrado mais de uma vez e vice-versa.

[074] Em uma modalidade particular, a pelo menos uma nanopartícula biocompatível é pelo menos administrada no início de um protocolo que compreende várias administrações pelo menos um carreador que compreende composto(s) de interesse, isto é, pelo menos na primeira administração do dito pelo menos um carreador e antes ou após administração do mesmo.

[075] Em outra modalidade particular, a nanopartícula biocompatível não é aplicada no início de um protocolo que compreende várias administrações do pelo menos um carreador que compreende (um) composto(s) de interesse e não é administrada antes da segunda ou terceira administração do dito pelo menos um carreador e antes ou após administração do mesmo.

[076] No contexto destas duas últimas modalidades, a pelo menos uma nanopartícula biocompatível também pode ser administrada em conjunto (antes ou depois, conforme explicado anteriormente) com o pelo menos um carreador que compreende o(s) composto(s) de interesse durante uma parte ou todas as administrações subsequentes do dito pelo menos um carreador.

[077] A(s) nanopartícula(s) biocompatível(is) da composição farmacêutica da invenção pode(m) ser

administrada(s) através de qualquer via, tal como a via intravenosa (IV), via intra-arterial, via intraperitoneal, via intradérmica, vias aéreas (inalação), via intramuscular e/ou via oral (*per os*). Uma via de administração preferida é a via intravenosa.

[078] O(s) carreador(es) que compreende o(s) composto(s) de interesse da composição farmacêutica da invenção pode(m) ser administrado(s) através de qualquer via selecionada a partir da via subcutânea, via intravenosa (IV), via intradérmica, via intra-arterial, vias aéreas (inalação), via intraperitoneal, via intramuscular, via oral (*per os*) e várias vias distintas dentre aquelas mencionadas anteriormente. A(s) via(s) adequada(s) será(ão) selecionada(s) pelo médico, dependendo da doença ou transtorno a ser detectado, prevenido ou tratado.

[079] Os exemplos a seguir ilustram a invenção sem limitar seu âmbito.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[080] Figura 1: Representação esquemática de carreadores desprovidos de qualquer agente de estabilização estericamente que contém pelo menos um composto de interesse. O carreador pode ser um carreador simples (a, b) ou um carreador oco (c, d). O composto de interesse é, em geral, retido ou impregnado (a, c) ou enxertado (ligado) no carreador com o auxílio de um ligante ou na ausência de qualquer ligante (b, d).

[081] Figura 2: a) Representação esquemática de um carreador que compreende pelo menos um composto de interesse. A superfície do carreador é modificada por um agente de estabilização estericamente, b) Representação

esquemática de uma composição farmacêutica de acordo com a invenção que compreende a combinação de (i) pelo menos uma nanopartícula biocompatível e de (ii) pelo menos um carreador que compreende pelo menos um composto de interesse, o carreador sendo desprovido de qualquer agente de estabilização estericamente.

[082] Figura 3: Fórmula química de ácido L-glutâmico, N-(3-carboxi-1-oxopropil)-, 1,5-di-hexadecil éster (SA-lipídio).

#### EXEMPLOS

Exemplo 1: Síntese n° 1 de lipossomas como nanopartículas biocompatíveis

[083] Lipossomas são preparados usando o método de reidratação de filme lipídico:

a) Os lipídios são dissolvidos em clorofórmio. O clorofórmio é finalmente evaporado sob um fluxo de nitrogênio. Reidratação do filme lipídico com HEPES a 20 mM e NaCl a 140 mM em um pH 7,4 é realizada a 50°C, de modo que a concentração lipídica seja de 5 mM.

[084] A composição lipídica a seguir foi usada para preparar lipossomas carregados: DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina): 86% molar; MPPC (monopalmitoilfosfatidilcolina): 10% molar; DSPE-PEG (diestearilfosfatidiletanolamina-[metoxi (polietilenoglicol)-2000]): 4% molar.

b) Ciclos de congelamento-descongelamento são, então, realizados 6 vezes ao mergulhar sucessivamente a amostra em nitrogênio líquido e em um banho de água regulado a 50°C.

c) Uma extrusora Thermobarrel (extrusora Lipex™,

Northern Lipids) foi usada para calibrar o tamanho dos lipossomas sob temperatura e pressão controladas. Em todos os casos, a extrusão foi realizada a 50°C sob uma pressão de 10 bares [1 MPa].

[085] A distribuição de tamanho dos lipossomas conforme preparados foi determinada por meio de dispersão dinâmica de luz (DLS) usando um Zetasizer NanoZS (instrumento Malvern) com um laser de HeNe de 633 nm em um ângulo de 90 °. A suspensão de lipossomas foi diluída 100 vezes em tampão de HEPES a 20 mM e NaCl a 140 mM em um pH 7,4. O tamanho dos lipossomas (isto é, diâmetro hidrodinâmico) era igual a cerca de 170 nm (distribuição por intensidade) com um índice de polidispersibilidade (PDI) igual a cerca de 0,1.

[086] Conforme compreensível por aqueles versados na técnica, a carga de superfície desejada foi obtida graças à composição lipídica selecionada e seu valor é confirmado pela medição do potencial zeta usando um Zetasizer NanoZS (instrumento Malvern).

[087] Os lipossomas foram diluídos 100 vezes em água e o pH da suspensão resultante foi ajustado para um pH 7,4. A carga de superfície do lipossoma era igual a cerca de - 14 mV em um pH 7,4.

Exemplo 2: Síntese n° 2 de lipossomas como nanopartículas biocompatíveis

[088] Lipossomas são preparados usando o método de reidratação de filme lipídico:

a) Os lipídios são dissolvidos em clorofórmio. O clorofórmio é finalmente evaporado sob um fluxo de nitrogênio. Reidratação do filme lipídico com HEPES a 20 mM e NaCl a 140 mM em um pH 7,4 é realizada a 65°C, de modo que a

concentração de lipídio seja de 25 mM.

[089] A composição lipídica a seguir foi usada para preparar lipossomas: DSPC (diestearoilfosfatidilcolina): DSPG (diestearoilfosfatidilglicerol): CHOL (colesterol) em uma proporção molar de 7:2:1.

b) Ciclos de congelamento-descongelamento são, então, realizados 6 vezes ao mergulhar sucessivamente a amostra em nitrogênio líquido e em um banho de água regulado a 65°C.

c) Uma extrusora Thermobarrel (extrusora Lipex™, Northern Lipids) foi usada para calibrar o tamanho dos lipossomas sob temperatura e pressão controladas. Primeiro, 5 passagens foram realizadas através de uma membrana de poliétersulfona (PES) com tamanho de poros de 0,45 µm a 5 bares [0,5 MPa], depois 10 passagens através de uma membrana de SPE com tamanho de poros de 0,22 µm a 10 bares [1 MPa] e, finalmente, 10 passagens através de uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com tamanho de poros de 0,1 µm a 15 bares [1,5 MPa].

[090] A distribuição de tamanho dos lipossomas conforme preparados foi determinada por meio de dispersão dinâmica de luz (DLS) usando um Zetasizer NanoZS (instrumento Malvern) com um laser de HeNe de 633 nm em um ângulo de 90°. A suspensão de lipossomas foi diluída 100 vezes em tampão de HEPES a 20 mM e NaCl a 140 mM em um pH 7,4. O tamanho dos lipossomas (isto é, diâmetro hidrodinâmico) era igual a cerca de 145 nm (distribuição por intensidade) com um índice de polidispersibilidade (PDI) igual a cerca de 0,1.

[091] A carga de superfície desejada a qual está, tipicamente, abaixo de - 10 mV, foi obtida graças à

composição lipídica selecionada e seu valor é confirmado por medição do potencial zeta usando um Zetasizer NanoZS (instrumento Malvern).

Exemplo 3: Método que permite uma eficácia aprimorada e/ou uma toxicidade reduzida após a administração, a um indivíduo, de um composto de interesse incluído na composição farmacêutica de acordo com a invenção em comparação com a mesma dose do composto de interesse apenas.

[092] Uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 que compreende a combinação de (i) pelo menos uma nanopartícula biocompatível e de (ii) pelo menos um carreador que compreende doxorubicina, é administrada a camundongos nus portadores de um tumor MDA-MB-231-lucD3H2LN xenoenxertado da seguinte maneira:

a) - administração, a um primeiro grupo de camundongos nus (por meio de injeção intravenosa), da Dox-NP® (uma formulação lipossômica peguilada de doxorubicina);

- administração, a um segundo grupo de camundongos nus (por meio de injeção intravenosa) da doxorubicina;

- administração, a um terceiro grupo de camundongos nus (por meio de injeção intravenosa), das nanopartículas biocompatíveis;

- administração, a um quarto grupo de camundongos nus (por meio de injeção intravenosa), das nanopartículas biocompatíveis e, entre mais de 5 minutos e 72 horas após administração das nanopartículas biocompatíveis ao quarto grupo de camundongos nus, administração (por meio de injeção intravenosa), ao dito quarto grupo de camundongos nus, de um carreador que compreende doxorubicina em que o carreador é desprovido de qualquer agente de estabilização estericamente;

b) Avaliação de quaisquer sinais clínicos de toxicidade em camundongos nus após administração da Dox-NP® (primeiro grupo), da doxorubicina (segundo grupo), das nanopartículas biocompatíveis (terceiro grupo) e da composição farmacêutica (quarto grupo); e

c) Medição do atraso de novo crescimento do tumor após administração da Dox-NP® (primeiro grupo), da doxorubicina (segundo grupo), das nanopartículas biocompatíveis (terceiro grupo) e da composição farmacêutica (quarto grupo).

Exemplo 4: Síntese nº 3 de lipossomas como nanopartículas biocompatíveis

[093] Lipossomas são preparados usando o método de reidratação de filme lipídico:

a) Os lipídios são dissolvidos em clorofórmio. O clorofórmio é finalmente evaporado sob um fluxo de nitrogênio para formar um filme lipídico sobre as paredes do tubo Pyrex. Reidratação do filme lipídico com HEPES a 25 mM e NaCl a 150 mM em um pH 7,4 é realizada a 60°C, de modo que a concentração de lipídio seja de 50 mM.

[094] A composição lipídica a seguir foi usada para preparar os lipossomas carregados: DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) 58% molar; HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada) 21% molar; CHOL (colesterol) 16% molar; POPS (1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilserina) 5% molar.

b) Ciclos de congelamento-descongelamento são, então, realizados 6 vezes ao mergulhar sucessivamente a amostra em nitrogênio líquido e em um banho de água regulado a 60°C. Ultrassonicação da solução de lipossomas é executada

durante 30 s a cada 3 ciclos de congelamento-descongelamento e imediatamente antes de extrusão.

c) Uma extrusora Thermobarrel (extrusora Lipex™, Northern Lipids) é usada para calibrar o tamanho dos lipossomas sob temperatura e pressão controladas. A extrusão é realizada a 60°C. Dez passagens são aplicadas através de uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com um tamanho de poros de 0,1 µm sob uma pressão de 10 bares [1 MPa].

[095] A distribuição de tamanho dos lipossomas conforme preparados é determinada por dispersão dinâmica de luz (DLS) usando um Zetasizer NanoZS (instrumento Malvern) com um laser de HeNe de 633 nm em um ângulo de 173°C. A solução de lipossomas é diluída 200 vezes em tampão de HEPES a 25 mM e NaCl a 150 mM em um pH 7,4. O tamanho dos lipossomas (isto é, diâmetro hidrodinâmico) é igual a cerca de 170 nm (distribuição por intensidade) com um índice de polidispersidade (PDI) igual a cerca de 0,2.

[096] Conforme compreensível por aqueles versados na técnica, a carga de superfície desejada é obtida graças à composição lipídica selecionada e seu valor é confirmado através de medição do potencial zeta usando um Zetasizer NanoZS (instrumento Malvern). Os lipossomas são diluídos 200 vezes em uma solução de cloreto de sódio a 1 mM e o pH da solução é ajustado para um pH 7. A carga de superfície dos lipossomas é igual a cerca de -40 mV em um de pH 7, NaCl a 1 mM.

[097] A concentração final de lipídio na solução de lipossomas é medida por meio de um ensaio colorimétrico (método de Bartlett). O método se baseia na

determinação de fósforo total por meio de uma digestão ácida de fosfolipídio. O fosfato inorgânico liberado é reagido com molibdato de amônio, o complexo fornecendo uma cor azul forte. A concentração de lipídios é igual a cerca de 50 mM.

Exemplo 5: Síntese n° 4 de lipossomas como nanopartículas biocompatíveis

[098] Lipossomas são preparados usando o método de reidratação de lipídico:

a) Os lipídios são dissolvidos em clorofórmio. O clorofórmio é finalmente evaporado sob um fluxo de nitrogênio para formar um filme lipídico nas paredes do tubo dPyrex. Reidratação do filme lipídico com HEPES a 25 mM e NaCl a 150 mM em um pH 7,4 é realizada a 60°C, de modo que a concentração de lipídio seja de 50 mM.

[099] A composição lipídica a seguir foi usada para preparar os lipossomas carregados: DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) 45,15% molar; CHOL (colesterol) 45,15% molar; DSPE-PEG (Diestearilfosfatidiletanolamina-[metoxi(polietilenoglicol)-2000]) 0,60% molar; ácido L-glutâmico, N-(3-carboxi-1-oxopropil)-, 1,5-di-hexadecil éster (SA-lipídio) 9,10% molar. O SA-lipídio traz grupos COOH sobre a superfície dos lipossomas.

b) Ciclos de congelamento-descongelamento são, então, realizados 6 vezes ao mergulhar sucessivamente a amostra em nitrogênio líquido e em um banho de água regulado a 60°C.

c) Uma extrusora Thermobarrel (extrusora Lipex™, Northern Lipids) é usada para calibrar o tamanho dos lipossomas sob temperatura e pressão controladas. A extrusão é realizada a 60°C. Sete passagens são aplicadas através de

uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com um tamanho de poros de 0,45 µm sob uma pressão de 3 bares [0,3 MPa] e dez passagens através de uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com um tamanho de poros de 0,22 µm sob uma pressão de 10 bares [1 MPa]. A distribuição de tamanho dos lipossomas conforme preparados é determinada por meio de dispersão dinâmica de luz (DLS) usando um Zetasizer NanoZS (instrumento Malvern) com um laser de HeNe de 633 nm em um ângulo de 173°. A solução de lipossomas é diluída 200 vezes em tampão de HEPES a 25 mM e NaCl a 150 mM em um pH 7,4. O tamanho dos lipossomas (isto é, diâmetro hidrodinâmico) é igual a cerca de 230 nm (distribuição por intensidade) com um índice de polidispersidade (PDI) igual a cerca de 0,2.

[0100] Conforme compreensível por aqueles versados na técnica, a carga de superfície desejada é obtida graças à composição lipídica selecionada e seu valor é confirmado por meio de medição do potencial zeta usando um Zetasizer NanoZS (instrumento Malvern). A solução de lipossomas é diluída 200 vezes em uma solução de cloreto de sódio a 1 mM e o pH da solução é ajustado para um pH 7. A carga de superfície dos lipossomas é igual a cerca de -60 mV em um pH 7, NaCl a 1 mM.

[0101] A concentração final de lipídios na solução de lipossomas é medida por um ensaio colorimétrico (método de Bartlett). O método se baseia na determinação de fósforo total por meio de uma digestão ácida de fosfolipídio. O fosfato inorgânico liberado é reagido com molibdato de amônio, o complexo fornecendo uma cor azul forte. A concentração de lipídios é igual a cerca de 50 mM.

Exemplo 6: Síntese n<sup>o</sup> 5 de lipossomas como

nanopartículas biocompatíveis

[0102] Lipossomas são preparados usando o método de reidratação de filme lipídico:

a) Os lipídios são dissolvidos em clorofórmio. O clorofórmio é finalmente evaporado sob um fluxo de nitrogênio para formar um filme lipídico sobre as paredes do tubo Pyrex. Reidratação do filme lipídico com HEPES a 25 mM e NaCl a 150 mM em um pH 7,4 é realizada a 60°C e a concentração de lipídios é de 50 mM. A composição lipídica a seguir foi usada para preparar os lipossomas de carga: DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina) 60% molar, CHOL (colesterol) 35% molar; e Succinil PE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-succinil) 5% molar.

b) Ciclos de congelamento-descongelamento são, então, realizados 6 vezes ao mergulhar sucessivamente a amostra em nitrogênio líquido e em um banho de água regulado a 60°C. Ultrassonicação da solução de lipossomas é realizada durante 30 s a cada 3 ciclos de congelamento-descongelamento e imediatamente antes de extrusão.

c) Uma extrusora Thermobarrel (extrusora Lipex™, Northern Lipids) é usada para calibrar o tamanho dos lipossomas sob temperatura e pressão controladas. A extrusão é realizada a 60°C. Doze passagens são aplicadas através de uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com tamanho de poros de 0,22 µm sob uma pressão de 12 bares [1,2 MPa].

d) Conjugação de p-aminofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo (MAN) a lipossoma de Succinil PE: A superfície do lipossoma de succinil PE é modificada com um ligante derivado de manose, p-aminofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo (MAN) usando acoplamento de carbodi-imida para desenvolver um lipossoma

conjugado com manose. MAN é covalentemente acoplado através de seu grupo amina ao grupo ácido carboxílico de Succinil PE, presente sobre a superfície do lipossoma de Succinil PE pré-formado. Resumidamente, à solução de lipossomas de Succinil PE pré-formada são adicionados EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodi-imida), (proporção molar de Succinil PE/EDC de 1:10) e N-hidroxissuccinimida (NHS) (proporção molar de NHS/EDC de 1:2,5). O pH da suspensão é, então, ajustado para 6 com NaOH a 1 M e a suspensão resultante é agitada durante 15 minutos em temperatura ambiente. Subsequentemente, o pH da solução é ajustado para 7 com NaOH a 1 M e a solução aquosa de MAN é adicionada (proporção molar de Succinil PE/MAN de 1:2) à solução. O pH é reajustado para 7 usando NaOH a 1M e a suspensão é agitada durante mais 2 horas em temperatura ambiente. As moléculas de MAN, EDC e NHS não ligadas em excesso são removidos através de 3 etapas de diálise com fator de diluição (x500; x500; x500) usando uma membrana de celulose de 50 kDa.

[0103] De nota, em virtude da possibilidade de diluição mediante diálise, a solução de lipossomas pode ser concentrada por meio de centrifugação (tipicamente em uma centrífuga Sigma 3-15K, a 5°C; 1.200 rpm) usando ultrafiltração em membrana em concentradores Vivaspin com uma membrana de polietileno sulfona (PES) e um corte de 300 kDa.

[0104] A distribuição de tamanho dos lipossomas conforme preparados é determinada por meio de dispersão dinâmica de luz (DLS), usando um Zetasizer NanoZS (instrumento Malvern) com um laser de HeNe de 633 nm em um ângulo de 173°. A solução de lipossomas é diluída 200 vezes em tampão de HEPES a 25 mM e NaCl a 150 mM em um pH 7,4. O

tamanho dos lipossomas (isto é, diâmetro hidrodinâmico) é de cerca de 230 nm (distribuição por intensidade) com um índice de polidispersidade (PDI) de cerca de 0,2. Conforme compreensível por aqueles versados na técnica, a carga de superfície desejada é obtida graças à composição lipídica selecionada e seu valor é confirmado através de medição do potencial zeta usando um Zetasizer NanoZS (instrumento Malvern). A solução de lipossomas é diluída 200 vezes em uma solução de cloreto de sódio a 1 mM e um pH 7. A carga de superfície dos lipossomas é de cerca de -70 mV em NaCl a 1 mM, pH 7. A concentração final de lipídios na solução de lipossomas é medida através de um ensaio colorimétrico (método de Bartlett). O método se baseia na determinação do fósforo total por meio de uma digestão ácida de fosfolipídio. O fosfato inorgânico liberado é reagido com molibdato de amônio, o complexo fornecendo uma cor azul forte. A concentração de lipídios é igual a cerca de 50 mM.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, **caracterizada por** compreender a combinação de (i) um lipossoma e (ii) um carreador que compreende um composto farmacêutico selecionado a partir de uma pequena molécula, um composto citotóxico e um complexo de coordenação de metal de transição; em que a dimensão mais longa do lipossoma está entre 4 nm e 500 nm e o valor de carga de superfície do lipossoma é negativo e abaixo de - 10 mV;

em que o carreador é um lipossoma; e

em que a superfície do carreador é desprovida de um polímero selecionado a partir de dextrana, ácido polissialílico (PSA), ácido hialurônico, quitosana, heparina, polivinilpirrolidona (PVP), álcool polivinílico (PVA), poli(acrilamida), poli(etileno glicol) (PEG) e um copolímero com base em PEG.

2. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** carreador ser um carreador oco.

3. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** carreador compreender dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) a 62% molar, fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) a 22% molar e colesterol (Chol) a 16% molar, ou dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) a 90% molar e monopalmitoilfosfatidilcolina (CPMP) a 10% molar, ou 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) em uma proporção molar de 3:1 e uma quantidade igual de N-(3'-O-colesteriloxicarbonil)-5-(N- etil-morfolina)-succinamida

(MoChol) e colesteril-hemissuccinato (CHEMS).

4. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** composto farmacêutico ser um composto citotóxico ou um complexo de coordenação de metal de transição.

5. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada pelo** composto citotóxico ser doxorubicina.

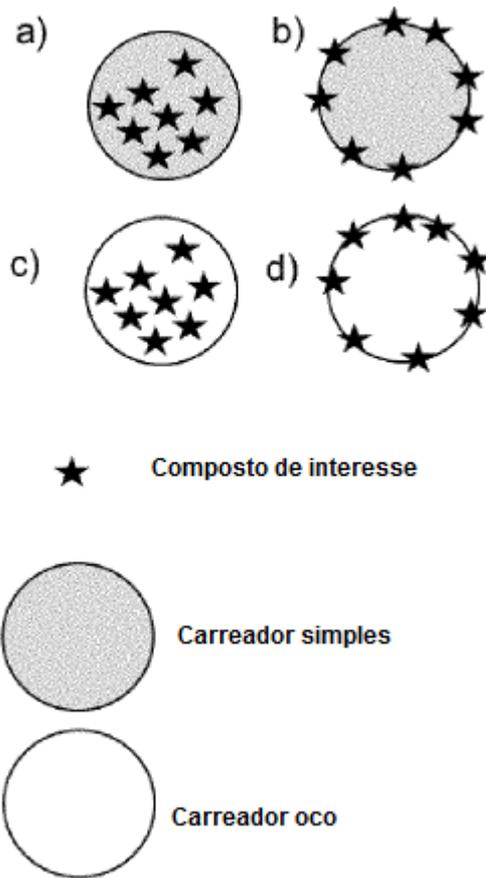


FIGURA 1

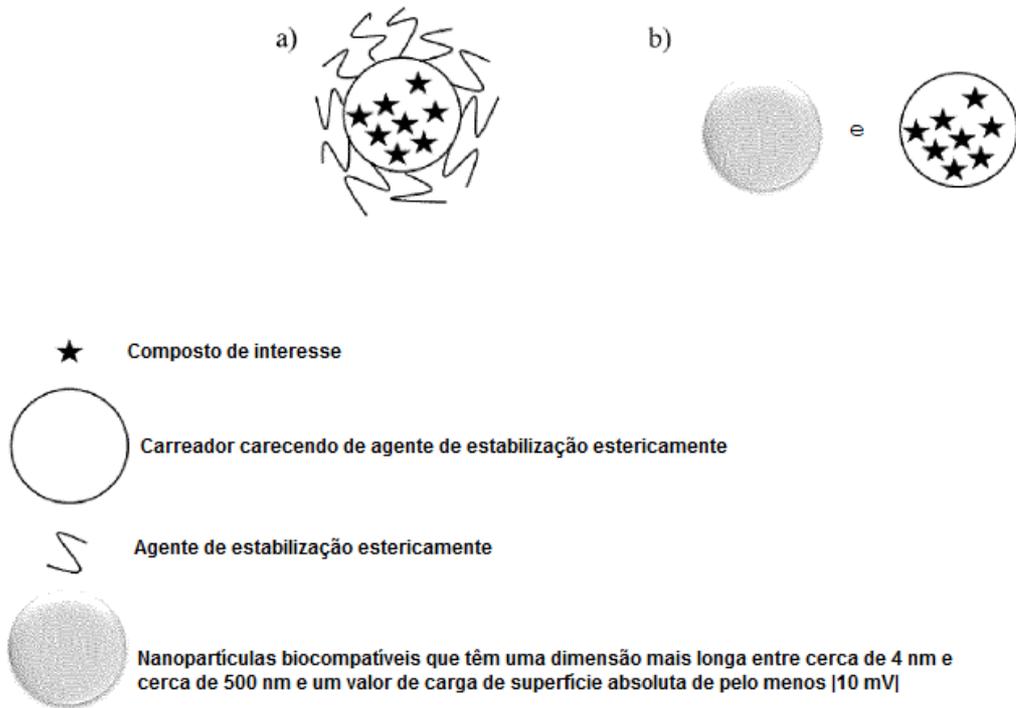


FIGURA 2

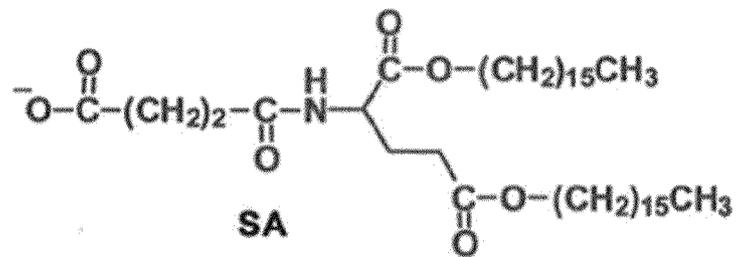


FIGURA 3