

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1997.03.03**

(30) Prioridade(s): **1996.03.04 US 12721 P**

(43) Data de publicação do pedido: **1998.12.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.05.11**  
**133/2011**

(73) Titular(es):

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF  
TECHNOLOGY  
77 MASSACHUSETTS AVENUE CAMBRIDGE,  
MA 02139 US  
THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION US**

(72) Inventor(es):

**ROBERT S. LANGER US  
DAVID A. EDWARDS US  
DANIEL R. DEEVER US**

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA  
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **MATERIAIS E MÉTODOS PARA AUMENTO DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR**

(57) Resumo:

SÃO DIVULGADAS COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DISTRIBUIÇÃO DE AGENTES ATRAVÉS DE MEMBRANAS CELULARES. AS COMPOSIÇÕES INCLUEM UM AGENTE A DISTRIBUIR, UM MATERIAL VISCOSO, TAL COMO UM HIDROGEL, LIPOGEL OU SOLUÇÃO COLOIDAL VISCOSA, E OPCIONALMENTE, UM TRANSPORTADOR QUE INCLUI UM LIGANDO QUE SE LIGA OU INTERAGE COM RECEPTORES DA SUPERFÍCIE DA MEMBRANA CELULAR. O AGENTE A DISTRIBUIR LIGA-SE OU INTERAGE DE OUTRO MODO COM RECEPTORES DA SUPERFÍCIE CELULAR, UNE-SE, COVALENTEMENTE OU IONICAMENTE, A UMA MOLÉCULA QUE SE LIGA OU INTERAGE COM UM RECEPTOR DA SUPERFÍCIE CELULAR, OU ESTÁ ASSOCIADO AO TRANSPORTADOR. OS AGENTES A DISTRIBUIR INCLUEM COMPOSTOS BIOACTIVOS E AGENTES DE DIAGNÓSTICO. AS COMPOSIÇÕES TÊM UMA VISCOSIDADE APARENTE QUASE IGUAL À VISCOSIDADE DO CITOSOL NA CÉLULA À QUAL O AGENTE É DISTRIBUÍDO. A VELOCIDADE DE INTERNALIZAÇÃO É SUPERIOR QUANDO A VISCOSIDADE DO MATERIAL VISCOSO E A DO CITOSOL NA CÉLULA SÃO APROXIMADAMENTE A MESMA, RELATIVAMENTE A QUANDO NÃO SÃO A MESMA. AS COMPOSIÇÕES AUMENTAM A ENTRADA CELULAR DE AGENTES BIOACTIVOS E DE MATERIAIS DE DIAGNÓSTICO QUANDO ADMINISTRADAS VAGINALMENTE, NASALMENTE, RECTALMENTE, OCULARMENTE, ORALMENTE OU AO SISTEMA RESPIRATÓRIO OU PULMONAR.

RESUMO

**"Materiais e métodos para aumento da internalização celular"**

São divulgadas composições e métodos para distribuição de agentes através de membranas celulares. As composições incluem um agente a distribuir, um material viscoso, tal como um hidrogel, lipogel ou solução coloidal viscosa, e opcionalmente, um transportador que inclui um ligando que se liga ou interage com receptores da superfície da membrana celular. O agente a distribuir liga-se ou interage de outro modo com receptores da superfície celular, une-se, covalentemente ou ionicamente, a uma molécula que se liga ou interage com um receptor da superfície celular, ou está associado ao transportador. Os agentes a distribuir incluem compostos bioactivos e agentes de diagnóstico. As composições têm uma viscosidade aparente quase igual à viscosidade do citosol na célula à qual o agente é distribuído. A velocidade de internalização é superior quando a viscosidade do material viscoso e a do citosol na célula são aproximadamente a mesma, relativamente a quando não são a mesma. As composições aumentam a entrada celular de agentes bioactivos e de materiais de diagnóstico quando administradas vaginalmente, nasalmente, rectalmente, ocularmente, oralmente ou ao sistema respiratório ou pulmonar.

## DESCRIÇÃO

### **"Materiais e métodos para aumento da internalização celular"**

#### **Campo do Invento**

As composições e métodos de utilização aqui descritos estão na área dos materiais e métodos para aumento da internalização celular.

#### **Antecedentes do Invento**

É frequentemente difícil distribuir compostos, tais como proteínas, péptidos, material genético e outros fármacos e compostos de diagnóstico intracelularmente porque as membranas celulares resistem frequentemente à passagem destes compostos. Foram desenvolvidos vários métodos para administrar agentes intracelularmente. Por exemplo, foi administrado material genético em células *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* utilizando vectores virais, complexos de ADN/lípidos e lipossomas. Embora os vectores virais sejam eficientes, permanecem questões sobre a segurança de um vector vivo e o desenvolvimento de uma resposta imunitária após administração repetida. Os complexos lipídicos e lipossomas parecem menos eficazes na transfecção de ADN para o núcleo da célula e podem potencialmente ser destruídos pelos macrófagos *in vivo*.

As proteínas e os péptidos são tipicamente administrados através de administração parentérica, ou, nalguns casos, através da membrana mucosa nasal. A toma de fármacos administrados topicamente é frequentemente fraca e ocorre frequentemente degradação quando os fármacos são administrados oralmente. Por exemplo, hormonas tais como a hormona libertadora da gonadotrofina ("GnRH") e seus análogos foram administrados a humanos numa tentativa de aumentar a fertilidade através do aumento dos níveis sistémicos de hormona luteinizante ("LH"). Mostrou-se que, quando dada frequentemente, doses baixas de GnRH nativa induzem desenvolvimento folicular e ovulação. Estes fármacos são tipicamente administrados através de um cateter implantado na cavidade abdominal. Uma bomba externa é ligada ao cateter que injecta o péptido a intervalos frequentes. Este método de

administração é extremamente invasivo e indesejável. Também, o método é proibitivamente dispendioso para utilizar em animais.

A ligação de ligandos ou proteínas de montagem a receptores da superfície de membranas de células eucarióticas foi extensivamente estudada num esforço para desenvolver melhores modos de promover ou aumentar a tomada celular. Por exemplo, foi relatado que a ligação de ligandos ou proteínas inicia ou acompanha uma cascata de fenómenos fora do equilíbrio culminando na invaginação celular de complexos membranares dentro de vesículas revestidas com clatrina [Goldstein, J.L., et al., (1983) *Ann. Rev. Cell Biol.* 1: 1-39; Rodman, T.S., et al., (1990) *Curr. Op. Cell Biol.* 2: 664-672; Trowbridge, I.S. (1991) *Curr. Op. Cell Biol.* 3: 634-641; Smythe, E., et al., (1989) *J. Cell Biol.* 108: 843-853; Smythe, E., et al., (1992) *J. Cell Biol.* 119: 1163-1171; e Schmid, S.L. (1993) *Curr. Op. Cell Biol.* 5: 621-627]. Este processo foi referido como endocitose mediada por receptores (RME). Para além de desempenhar um papel central no tráfico lipídico [Pagano, R.E. (1990) *Curr. Op. Cell Biol.* 2: 652-663], RME é o principal meio através do qual as macromoléculas entram nas células eucarióticas. Possuir uma melhor compreensão do papel de RME na tomada de fármacos seria vantajoso no desenvolvimento de métodos melhorados de distribuição de fármacos.

Seria vantajoso ter novos métodos para a distribuição de uma GnRH e seus análogos intracelularmente. É portanto um objectivo do presente invento para proporcionar composições e métodos para aumento da distribuição intracelular de GnRH e seus análogos. É outro objectivo do presente invento proporcionar métodos menos invasivos para distribuição de GnRH e seus análogos.

### **Sumário do Invento**

São divulgadas composições e métodos para melhorar a internalização celular de GnRH e seus análogos. As composições incluem um composto a distribuir e um hidrogel viscoso biocompatível. Através do controlo da viscosidade aparente do material viscoso, as velocidades de endocitose,

incluindo "pinocitose" não específica e endocitose mediada por receptores ("RME") específica, são aumentadas. A velocidade de internalização endocítica é aumentada quando a razão das viscosidades aparentes dos meios citosólico e extracelular se aproxima da unidade. Isto conduz a elevadas velocidades de transporte dos compostos a distribuir através das membranas celulares, facilitando uma distribuição mais eficiente de fármacos e agentes de diagnóstico.

A viscosidade aparente da composição é controlada de modo a residir no intervalo entre 10 e 200 Poise, por exemplo entre 50 e 200 Poise ( $1 \text{ poise} = 0,1 \text{ Nm}^{-2}\text{s}$ ).

As composições são aplicadas às membranas celulares para alcançar velocidades elevadas de transporte de fármacos através dessas membranas, relativamente a quando são utilizados fluidos não viscosos. Os métodos para administração das composições incluem aplicação tópica ou através de injeção. As composições podem ser aplicadas topicamente, oralmente, nasalmente, vaginalmente, rectalmente e ocularmente. As composições podem ser aplicadas por injeção através de cateter, intramuscularmente, subcutaneamente ou intraperitonealmente. As composições podem também ser administradas ao sistema pulmonar ou respiratório, de preferência num aerossol.

Os exemplos demonstram a administração de transferrina a células individuais para aumentar a velocidade de tomada de transferrina e a administração intravaginal de leuprolide para aumentar os níveis de LH em ovelhas. A transferrina é um polipéptido modelo. As composições contendo transferrina não são elas próprias concretizações do invento reivindicado.

### **Breve Descrição dos Desenhos**

A Figura 1 mostra a viscosidade aparente *versus* tensão de cisalhamento aplicada para várias soluções de metocel (0, 1, 1,25, 1,5, 1,7, e 1,8%). É mostrado um valor característico da viscosidade celular. As linhas verticais tracejadas representam estimativas dos valores máximo e mínimo da força transmitida por uma célula para o fluido extracelular pelas cavidades de invaginação.

A Figura 2 mostra valores de estado estacionário de  $^{125}\text{I-Tf}$  internalizada total sobre  $^{125}\text{I-Tf}$  associada à superfície total (In/Sur) para células K562 suspensas em soluções de metocel de concentração variável de metocel entre 0 e 2%. As barras de erro representam o erro médio padrão, com  $n=4$ .

A Figura 3 mostra os valores de estado estacionário de  $^{125}\text{I-Tf}$  internalizada total sobre  $^{125}\text{I-Tf}$  associada à superfície total (In/Sur) para células CHO suspensas (linha superior com blocos vazios) e aderentes (linha inferior com blocos a cheio) em soluções de metocel de concentração variável de metocel. As barras de erros significam o erro padrão, com  $n=4$ .

A Figura 4 mostra a concentração sistêmica de LH após administração intravaginal a ovelhas de leuprolide em soluções de metocel a 1,5% e 1,75%.

A Figura 5 mostra a biodisponibilidade absoluta de leuprolide (biodisponibilidade percentual) de sistemas de distribuição de hidrogel otimizados reologicamente (metocel a 1,5 e 1,75%) em comparação com um sistema de distribuição de hidrogel de controlo.

A Figura 6 mostra a concentração sistêmica de LH após administração intranasal de 100  $\mu\text{g}$  de acetato de leuprolide em metocel a 1,5% e metocel a 0,0% (controlo de solução salina) a ovelhas.

A Figura 7 mostra a concentração sistêmica de cortisol (ng/mL) após administração intravenosa e intravaginal de vasopressina a ovelhas. Os círculos mais escuros representam administração IV (10 microgramas de vasopressina) sem um transportador viscoso. Os círculos vazios representam o controlo, sem gel viscoso nem vasopressina. Os triângulos mais escuros representam administração intravaginal de 200  $\mu\text{g}$  de vasopressina em metocel a 1,5%. Os triângulos vazios representam a administração intravaginal de 200  $\mu\text{g}$  de vasopressina em metocel a 1,75%.

### **Descrição Detalhada do Invento**

São descritas composições e métodos para distribuição intracelular de compostos numa solução viscosa aumentando a tomada. A internalização celular é aumentada através do aumento da velocidade de endocitose, particularmente endocitose mediada por receptores, através do controlo da viscosidade da solução. As composições incluem GnRH ou um análogo desta e um fluido com uma viscosidade aparente aproximadamente igual à viscosidade aparente do fluido citosólico na célula à qual a composição é administrada.

A GnRH e seus análogos interagem com receptores à superfície da célula à qual serão administrados.

### **Composições**

A ligação de ligandos ou proteínas de montagem a receptores de superfície de membranas de células eucarióticas inicia ou acompanha uma cascata de fenómenos fora do equilíbrio culminando na invaginação celular de complexos membranares dentro de vesículas revestidas com clatrina. Este processo é conhecido como endocitose mediada por receptores (RME). A RME é o principal meio através do qual vários tipos de moléculas bioactivas, particularmente macromoléculas, entram em células eucarióticas.

A investigação por outros centrou-se principalmente na identificação e caracterização bioquímica dos estados inicial e tardio da RME, variando da formação de uma cavidade revestida com clatrina à separação de uma vesícula revestida. A determinação das composições e dos métodos para administrar intracelularmente os compostos aqui descritos envolveu o foco num aspecto diferente de RME, o processo no qual uma depressão na membrana é inicialmente formada no início de RME (i.e. o mecanismo através do qual ocorre um impulso espontâneo da membrana celular para o citosol). Este processo é aqui referido como "estado de nucleação" de RME. Pretende-se que esta terminologia enfatize que a força motriz para o impulso espontâneo da membrana para o citosol está relacionada com a energia libertada por uma ou mais de muitas reacções de ligação à membrana exotérmicas possíveis, i.e.,

ligação receptor-ligando, que precedem ou acompanham a formação de uma depressão na membrana.

As membranas celulares ligam-se do exterior através do fluido extracelular e de dentro através do fluido citosólico. Os fluidos inter- e extracelulares possuem diferentes propriedades físicas, tais como densidade e viscosidade do fluido, cujos valores se estendem até à superfície da membrana onde sofrem descontinuidades. A própria membrana possui propriedades únicas de equilíbrio e fora do equilíbrio. Uma propriedade importante quando se considera distribuição intracelular é a tensão da membrana (a energia livre da membrana por unidade de área de superfície). A tensão membranar é geralmente uniforme e positiva numa membrana em equilíbrio e pode ser medida através de experiências de rotina com micropipeta. Valores de tensão membranar mais relatados foram reunidos para glóbulos vermelhos e variam de 4 dyne/cm a 0,01 dyne/cm. Em contraste, a tensão interfacial de uma interface ar/água é de 73 dyne/cm. A tensão membranar pode variar de ponto para ponto na superfície membranar em consequência de vários estímulos, tais como aquecimento não uniforme da membrana, reacções químicas da membrana e alterações de composição da membrana. Estas variações podem dar origem a movimento da membrana e de volumes de fluido, designados por convecção de Marangoni. Este movimento caracteriza-se na maior parte pelas viscosidades (aparentes) citosólica e extracelular.

Reacções exotérmicas podem ocorrer na membrana celular, devido à ligação ligando-receptor, ligação adaptador-membrana, ligação clatrina-membrana, uma combinação destas reacções de ligação, e outras reacções membranares. As reacções exotérmicas fazem com que tensão membranar (energia por área de membrana), pelo menos momentaneamente, sejam diminuídas no ponto onde a reacção ocorreu. À medida que a tensão membranar é reduzida, as energias potenciais da configuração e intermoleculares dos complexos moleculares ligados à membrana são também reduzidas.

A tensão membranar da célula é espacialmente não uniforme em consequência das reacções exotérmicas (i.e., formação de complexos membranares), resultando em movimento



membranas. Este movimento possuirá uma componente substancial para o citosol celular desde que a viscosidade citosólica exceda a do fluido extracelular.

Este movimento membranar provoca deformação da membrana, um evento contrariado pela tensão membranar. Quando as diferenças entre as viscosidades aparentes do fluido citosólico e do fluido extracelular são extremamente grandes, a deformação da membrana é fortemente contrariada e o impulso inicial da membrana é amortecido. No entanto, à medida que as diferenças entre as viscosidades aparentes do fluido citosólico e do fluido extracelular se tornam extremamente pequenas, a deformação da membrana torna-se progressivamente rápida.

Conseqüentemente, a velocidade de endocitose pode ser aumentada através de ajuste da viscosidade do fluido extracelular para que seja aproximadamente a mesma que a do fluido citosólico. Se a viscosidade do fluido extracelular for apreciavelmente superior ou inferior à do fluido citosólico, a velocidade de endocitose diminui. Isto foi mostrado experimentalmente no Exemplo 1 e na Figura 3, nos quais a razão de compostos que foram internalizados para aqueles que permaneceram à superfície (In/Sur) aumentou à medida que a viscosidade do fluido extracelular aumentou, até um ponto ao qual a viscosidade se aproximou da do fluido citosólico. Acima desse valor a razão diminuiu.

O agrupamento de complexos membranares é favorável à rápida internalização. A velocidade de internalização pode ser aumentada em proporção à grandeza da energia de ligação. Isto é devido, em parte, à especificidade dos receptores para determinados ligandos e/ou proteínas adaptadoras.

O agrupamento de complexos ocorre na vizinhança de cavidades às quais tríscelos de clatrina se absorvem do lado citosólico da membrana celular e subsequentemente polimerizam para formar um revestimento de clatrina. Algum agrupamento foi também observado na vizinhança de cavéolas, ou cavidades não revestidas de clatrina. A depressão da tensão membranar que ocorre dentro da vizinhança de uma cavidade em evolução, com origem no processo de complexação membranar, é

directamente proporcional ao número de complexos membranares formados dentro dessa cavidade. Em geral, verificou-se que os complexos agrupados internalizam substâncias mais rapidamente que os complexos não agrupados.

Verificou-se que a grandeza da diferença da viscosidade aparente e do agrupamento de receptores altera a velocidade de RME. A tensão membranares pode também ser manipulada para influenciar a velocidade de RME. O aumento da tensão membranares "endurece" a membrana celular, tornando a depressão da membrana celular crescentemente proibitiva. Este fenómeno foi comentado por Sheetz, M.P. e Dai, J. (1995), apresentado no "60th Annual Cold Spring Harbor Symposium on Protein Kinases", Cold Spring Harbor, N.Y., com base em estudos que mostram uma maior velocidade de endocitose para cones de crescimento neuronais coincidindo com a redução da tensão membranares.

Consequentemente, a velocidade de internalização pode ser aumentada através de a) ajuste da viscosidade do fluido extracelular para a aproximar à do fluido citosólico; b) formação de complexos do material a internalizar; e c) redução da tensão membranares. Composições e métodos para aumento da velocidade de endocitose são descritos em detalhe abaixo.

#### **A. Hidrogéis Viscosos**

Fluidos viscosos adequados para utilizar em administração intracelular de compostos de acordo com o invento incluem hidrogéis biocompatíveis.

Um hidrogel é definido como uma substância formada quando um polímero orgânico (natural ou sintético) é reticulado através de ligações covalentes, iónicas ou pontes de hidrogénio para criar uma estrutura tridimensional de grade aberta que aprisiona moléculas de água para formar um gel. Exemplos de materiais que podem ser utilizados para formar um hidrogel incluem polissacáridos, proteínas e polímeros sintéticos. Exemplos de polissacáridos incluem celulosas tais como metilcelulose, dextranos e alginato. Exemplos de proteínas incluem gelatina e ácido hialurónico.

Exemplos de polímeros sintéticos incluem polímeros biodegradáveis e não degradáveis (embora sejam preferidos polímeros biodegradáveis), tais como álcool polivinílico, poliacrilamida, polifosfazinas, poliacrilatos, óxido de polietileno e copolímeros de blocos de óxido de polialquileno ("poloxâmeros™") tais como Pluronic™ ou Tetronics™ (copolímeros de blocos de óxido de polietileno-polipropilenoglicol).

Em geral, estes polímeros são pelo menos parcialmente solúveis em soluções aquosas, tais como água, soluções de sais tamponadas, ou soluções aquosas de álcoois. Vários destes possuem grupos laterais com carga ou um sal iónico monovalente destes. Exemplos de polímeros com grupos laterais ácidos que podem reagir com catiões são polifosfazenos, ácidos poliacrílicos, ácidos poli(met)acrílicos, acetato de polivinilo, e polímeros sulfonatados, tais como polistireno sulfonatado. Copolímeros possuindo grupos laterais ácidos formados através de reacção de ácido acrílico ou metacrílico e monómeros ou polímeros de éter vinílico podem também ser utilizados. Exemplos de grupos ácidos são grupos de ácido carboxílico, grupos de ácido sulfónico, grupos de álcool halogenado (de preferência fluorados), grupo OH fenólicos, e grupos OH ácidos.

Exemplos de polímeros com grupos laterais básicos que podem reagir com aniões são polivinil-aminas, polivinil-piridina, polivinil-imidazole, polivinilpirrolidona e alguns polifosfazenos substituídos com imino. O sal de amónio ou quaternário dos polímeros pode também ser formado a partir dos grupos de azoto estruturais ou imino pendentes. Exemplos de grupos laterais básicos são os grupos amino e imino.

O alginato pode ser reticulado ionicamente com catiões bivalentes, em água, à temperatura ambiente, para formar uma matriz de hidrogel. Uma solução aquosa contendo o agente a distribuir pode ser suspensa numa solução de um polímero solúvel em água, e a suspensão pode ser formada em gotículas que são configuradas em microcápsulas discretas através do contacto com catiões multivalentes. Opcionalmente, a superfície das microcápsulas pode ser reticulada com

poliaminoácidos para formar uma membrana semipermeável em torno dos materiais encapsulados.

Os polifosfazenos adequados para reticulação têm a maioria dos grupos das cadeias laterais ácidos e capazes de formar pontes salinas com catiões bivalentes ou trivalentes. Exemplos de grupos laterais ácidos preferidos são grupos de ácido carboxílico e grupos de ácido sulfônico. Os polifosfazenos hidroliticamente estáveis são formados de monómeros possuindo grupos laterais de ácido carboxílico que são reticulados através de catiões bivalentes ou trivalentes tais como  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Al}^{3+}$ . Podem ser sintetizados polímeros que se degradam por hidrólise através da incorporação de monómeros possuindo grupos laterais de imidazole, éster de aminoácidos ou glicerol. Por exemplo, pode ser sintetizado um poli[bis(carboxilatofenoxi)]fosfazeno (PCPP) polianiónico, que é reticulado com catiões multivalentes dissolvidos em meio aquoso à temperatura ambiente ou abaixo para formar matrizes de hidrogel.

Os métodos para a síntese dos polímeros descritos acima são conhecidos dos peritos na arte. Ver, por exemplo "Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts", E. Goethals, editor (Pergamen Press, Elmsford, NY 1980). Muitos destes polímeros estão comercialmente disponíveis.

Hidrogéis preferidos incluem redes de polímeros enchidas de água, compostas de celulosas tais como metilcelulose, dextranos, agarose, álcool polivinílico, ácido hialurônico, poliacrilamida, óxido de polietileno e polímeros de polioxialquileno ("poloxâmeros"), especialmente copolímeros de blocos de óxido de polietileno-polipropilenoglicol, tal como descrito na Patente U.S. No. 4810503. Vários poloxâmeros estão comercialmente disponíveis em BASF e em Wyandotte Chemical Corporation como "Pluronic". Estão disponíveis em pesos moleculares médios de cerca de 1100 a cerca de 15500.

A viscosidade aparente do fluido extracelular (a composição) tem de ser aproximadamente igual à viscosidade do fluido citosólico na célula à qual se pretende administrar os compostos. De acordo com o invento, a viscosidade aparente é

de 10-200 Poise (1 a 20 Pa.s). Um perito na arte pode facilmente determinar ou chegar a uma estimativa razoável da viscosidade do fluido citosólico utilizando um viscómetro e medindo a tensão aplicada dividida pela taxa de deformação à tensão aplicada que corresponde à tensão que a membrana celular transmite aos fluidos citosólico e extracelular durante a endocitose. Métodos para medição da viscosidade citosólica incluem métodos de micropipeta (Evans e Young, *Biophys. J.*, 56: 151-160 (1989)) e métodos envolvendo o movimento de colóides ligados à membrana (Wang *et al.*, *Science*, 260: 1124-1126 (1993)). Viscosidades citosólicas típicas, medidas através destas técnicas, variam de aproximadamente 50-200 Poise. Uma vez medido este valor, a viscosidade da composição pode ser ajustada a 10-200 Poise, quando medida utilizando um reómetro de tensão controlada a 37°C utilizando uma geometria de cone e prato na tensão aplicada que corresponde à tensão que a membrana celular transmite aos fluidos citosólico e extracelular durante a endocitose (i.e. 1 a 100 Pa).

A viscosidade pode ser controlada através de qualquer método adequado conhecido dos peritos na arte. O método para obtenção de uma composição viscosa com a viscosidade aparente desejada não está particularmente limitado uma vez que é o valor da viscosidade aparente relativamente às células alvo que é crítico. A viscosidade aparente pode ser controlada através de ajuste do teor de solvente (i.e., água), tipos de materiais, força iónica, pH, temperatura, química de polímeros ou polissacáridos realizada nos materiais, e/ou, campos eléctricos, de ultra-sons ou magnéticos externos, entre outros parâmetros.

A viscosidade aparente das composições é controlada de modo a residir no intervalo de entre 10 e 200 Poise, de preferência entre 50 e 200 Poise. A viscosidade aparente é medida através de um reómetro padrão utilizando um intervalo de tensão aplicada de entre 1 e 100 Pascal.

A composição pode ser administrada como uma formulação apenas ligeiramente viscosa que se torna mais viscosa em resposta a uma condição no corpo, tal como temperatura corporal ou um estímulo fisiológico, como iões de cálcio ou

pH, ou em resposta a uma condição aplicada externamente, tal como campos de ultra-sons ou eléctricos ou magnéticos. Um exemplo é um poloxâmero sensível à temperatura que aumenta em viscosidade à temperatura corporal.

Os seguintes são exemplos de intervalos de concentração adequados: soluções de metilcelulose (metocel) no intervalo de entre 1,0 e 2,0% (p/p), soluções de álcool polivinílico entre 5 e 15% e soluções de ácido plurónico entre 15 e 20%.

### **Métodos de Administração**

As composições podem ser aplicadas topicamente na vagina, no recto, no nariz, no olho, no ouvido, na boca e no sistema respiratório ou pulmonar, ou sistemicamente a outros tipos de células, i.e., através de distribuição intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. De preferência, as composições são aplicadas directamente às células epiteliais às quais se pretende distribuir o composto.

As composições são particularmente vantajosas para terapia hormonal. Ao distribuir a composição contendo GnRH ou seus análogos através das membranas vaginais ou nasais, as composições podem ser utilizadas para tratar uma variedade de distúrbios humanos baseados em hormonas. Os Exemplos 2 e 3 demonstram a eficácia das composições para aumentar os níveis de LH quando uma composição incluindo leuprolide foi aplicada às membranas vaginais ou nasais.

Espera-se que a dosagem varie dependendo de vários factores, incluindo o paciente, o composto bioactivo particular a distribuir, e a natureza da condição a tratar, entre outros factores. Um perito na arte pode facilmente determinar uma quantidade eficaz do composto ou compostos bioactivos a administrar a um paciente a necessitar destes.

As composições são administradas às células para aumentar a velocidade de transporte de fármaco através das membranas celulares, relativamente à velocidade de distribuição quando são utilizados fluidos não viscosos. Exemplos de métodos de administração incluem administração oral, como numa formulação líquida ou dentro de alimentos

sólidos, administração tópica na pele ou na superfície do olho, administração intravaginal, administração rectal, administração intranasal, administração através de inalação, administração através de um cateter e administração através de injeção intraperitoneal, intramuscular ou subcutânea.

Quando a composição é administrada oralmente ou através de inalação, é preferido que seja administrada como um pó seco que inclui um hidrogel intumescível desenhado para inchar até uma viscosidade apropriada após distribuição no local desejado. Após inalação, por exemplo, o hidrogel absorve água para obter a viscosidade desejada e depois distribui agentes ao sistema respiratório. Quando administrado oralmente, pode ser seleccionado um hidrogel que não absorva água sob as condições presentes no tracto gastrointestinal superior, mas que absorva água sob as condições presentes no tracto gastrointestinal inferior (i.e., a um pH superior a cerca de 6,5). Tais hidrogéis são bem conhecidos dos peritos na arte. A utilização de tais composições pode optimizar a distribuição de agentes ao tracto gastrointestinal inferior.

### **Métodos para Redução ou Elevação da Tensão Membranar**

A eficiência do método pode ser aumentada reduzindo a tensão membranar. Métodos adequados para redução da tensão membranar incluem inclusão de um agente de superfície activa biocompatível no hidrogel, efectuando reacções exotérmicas na superfície celular (i.e., formação de complexos), e aplicação de um campo externo à superfície celular. Agentes de superfície activa biocompatíveis adequados incluem surfactina, trealose, ácidos gordos tais como palmitina e ácido oleico, polietilenoglicol, hexadecanol e fosfolípidos tais como fosfatidilcolinas e fosfatidilgliceróis. Reacções químicas de formação de complexos adequadas incluem a reacção de ligandos de ligação ao receptor com receptores da superfície celular para estes ligandos, reacções exotérmicas tais como ocorrem entre salicilato de sódio e ácido salicílico, e reacções de neutralização tais como entre ácido clorídrico e amónia (Edwards *et al.*, 1996 *Biophys. J.* 71: 1208-1214). Campos externos que podem ser aplicados à superfície celular para reduzir a tensão membranar incluem

ultra-sons, campos eléctricos e feixes de luz focada, tais como feixes laser.

### **Métodos para Causar o Agrupamento de Receptores**

A velocidade de internalização celular pode também ser aumentada causando o agrupamento de receptores na membrana celular. Isto pode ser alcançado, por exemplo, criando zonas na membrana onde a tensão membranar é relativamente elevada, fazendo com que o fluido membranar flua para a zona de elevada tensão membranar. Este fluxo pode transportar receptores localizados na membrana, uns contra os outros, fazendo com que se agrupem.

Os critérios para avaliação de resposta a modalidades terapêuticas empregando um composto identificado são ditados pela condição específica e geralmente seguirão práticas médicas padrão. Uma tal avaliação pode ser feita através da determinação de se existe um efeito desejado, tal como expressão de uma molécula nucleotídica, produção de uma proteína, ou um conseqüente efeito fisiológico. Quando se sabe ou suspeita que o composto administrado envolve a função ou expressão de outra molécula envolvida numa condição de doença, a eficácia de administração do composto pode ser avaliada através da medição das alterações nas características da condição de doença.

As composições e métodos de utilização destas aqui descritos serão mais claramente compreendidos com referência aos seguintes exemplos:

#### **Exemplo 1: Hidrogéis Viscosos com Viscosidade Óptima para Internalização Celular**

##### **Materiais e Métodos**

**Reagentes.** A transferrina humana marcada com  $^{125}\text{I}$  foi adquirida em Amersham (Arlington Heights IL). Todos os outros químicos, incluindo a apo-transferrina humana e metilcelulose (PM = 80 KDa), foram obtidos em Sigma (St. Louis, MO).



**Cultura Celular e Preparação.** Células K562 de eritroleucemia humana, foram criadas em meio RPMI-1640 suplementado com 50 unidades/ml de penicilina, 0,05 mg/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM, e soro fetal bovino a 10%. Células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com receptor de transferrina humano, uma generosa oferta do Dr. Timothy McGraw (Columbia University, New York, NY), foram criadas em meio 5A de McCoy suplementado com 50 unidades/ml de penicilina, 0,05 mg/ml de estreptonigrina, L-Glutamina 2 mM, e soro fetal bovino a 5%.

Imediatamente antes de cada experiência, todas as células foram lavadas duas vezes com 40 ml de tampão gelado (Hepes 25 mM, NaCl 150 mM, 1 mg/ml de dextrose, e 1 mg/ml de albumina de soro bovino, pH 7,4), e centrifugadas a 600 g a 4°C durante 10 minutos.

#### **Preparação e Caracterização de Metilcelulose.**

As soluções de metilcelulose foram feitas em tampão com a técnica de dispersão formulada por Dow Chemical Co. para alcançar uma concentração final de 0,0 a 1,8%. Resumidamente, após um terço do volume do tampão ser aquecido a 90°C, foi adicionada ao líquido metilcelulose em pó e agitada até as partículas estarem completamente humedecidas e uniformemente dispersas. O restante do tampão foi então adicionado à metilcelulose a 4°C. A agitação foi mantida a 4°C durante mais 20 minutos. Um dia antes das experiências, transferrina marcada com  $^{125}\text{I}$  (0,03  $\mu\text{Ci/ml}$ ) e transferrina não marcada (50 nM) foram adicionadas a cada concentração de solução de metilcelulose e bem misturadas.

A viscosidade aparente das soluções de metocel foi medida num reómetro de tensão controlada (TA Instruments CSL-500) utilizando uma geometria de cone e prato. Todos os dados mostrados na Figura 1 foram obtidos reduzindo exponencialmente a tensão imposta externamente a uma velocidade constante de 100 Pa a 1 Pa.

### **Endocitose.**

As razões de estado estacionário de transferrina total internalizada para transferrina ligada à superfície foram determinadas como se segue: A 4°C,  $2 \times 10^6$  células foram ressuspensas em 1 ml de solução de metilcelulose (concentração variando de 0,0 a 1,8%) contendo transferrina radiomarcada e não marcada. Foi utilizada uma pipeta de pasteur para misturar suavemente as células e a solução de metilcelulose. Imediatamente após aquecimento num banho-maria a 37°C durante 5 minutos, as amostras foram transferidas para uma câmara térmica a 37°C, onde foi mantida uma rotação lenta das amostras. Após 1 h, a endocitose foi terminada através da adição rápida de 12 ml de solução salina equilibrada de Hank (HBSS) gelada, seguida de mais 3 lavagens de 12 ml de HBSS gelada e subsequente centrifugação (1200 g a 4°C). Após a lavagem, as células foram divididas em dois volumes iguais. As células de ambos os conjuntos de alíquotas foram sedimentadas. As amostras do primeiro conjunto foram contadas com um contador gama (modelo 1274 Ria Gamma, LKB Wallac. Finlândia) para obter a radioatividade total. Os níveis de radioatividade interna (In) e à superfície (Sur) foram determinados a partir do segundo conjunto de amostras utilizando o método de Schonhorn *et al.* [Schonhorn, J.E. e Wessling-Resnick, M. (1994) *Molecular and Cellular Biochem.* 135: 159-169]. Resumidamente, os sedimentos foram incubados com 0,5 ml de solução de tripsina (Hepes 25 mM, NaCl 150 mM com 1 mg/ml de tripsina bovina, pH 7,4) a 4°C. Os sobrenadantes e os sedimentos foram separados através de centrifugação a 3000 g a 4°C durante 15 minutos. Foram utilizados para lavar os sedimentos 2 ml de HBSS. Os sedimentos finais foram contados num contador gama para dar o valor In, enquanto que os sobrenadantes de cada lavagem foram combinados para dar o valor Sur.

Os valores de internalização foram representados na forma da radioatividade total internalizada (In) dividida pela radioatividade total ligada à superfície (Sur) por milhão de células, aqui definidos como In/Sur de estado estacionário. Os valores de estado estacionário de In/Sur para as células de um dado tipo em meio metocel variável proporcionam estimativas relativas da velocidade de

endocitose para endocitose mediada por Tf, particularmente quando é assumido que as velocidades de reciclagem de Tf são independentes da reologia do meio extracelular. Não é esperada subregulação do número de receptores de Tf ligados à membrana durante a duração das experiências dada a reciclagem preferencial de receptores de Tf na superfície celular após internalização.

### **O papel da viscosidade extracelular na velocidade de endocitose.**

Tal como aqui discutido, a viscosidade dos fluidos extracelulares influencia a velocidade líquida de endocitose. O controlo da viscosidade extracelular afecta a internalização de estado estacionário do receptor de Tf (ligado a  $^{125}\text{I}$ -Tf) em células K562, uma linha celular humana de eritroleucemia que tem sido comumente empregue em estudos de endocitose mediada por Tf [Schonhorn, J.E. e Wessling-Resnick, M. (1994) *Molecular and Cellular Biochem.* 135: 159-169], e pode também afectar a endocitose mediada por Tf em células CHO (ovário de hamster chinês) transfectadas com receptor de transferrina humano [McGraw, T.E., Greenfield, L. e Maxfield, F.R. (1987) *J. Cell Biol.* 105: 207-214]. Estas últimas células não expressam receptor de transferrina de hamster endógeno funcional, e proporcionam uma linha celular única com a qual os resultados obtidos com as células K562 podem ser comparados.

As células K562 foram suspensas em meio tampão aquoso contendo metilcelulose entre 0,0% a 1,8% (metocel). As medições reológicas (Figura 1) indicam que este intervalo de concentração de metocel dota o fluido extracelular com uma viscosidade aparente variando da viscosidade da água até uma excedendo a característica do citosol celular. As viscosidades aparentes (definidas como tensão de cisalhamento medida sobre a taxa de deformação aplicada) dos metocels variam grandemente dependendo da força líquida distribuída à membrana celular conduzindo à formação de cavidades. É possível mostrar (ver legenda da Figura 1) que a força máxima distribuída por uma célula ao fluido extracelular através da invaginação de cavidades varia de aproximadamente 1 a 10 Pa, dependendo de se ocorreu agrupamento de receptores.

A Figura 2 mostra valores de internalização de estado estacionário em K562 de  $^{125}\text{I}$ -Tf em função da concentração de metocel. A velocidade de endocitose aumenta com a concentração crescente de metocel de 1,25% a 1,7%, para além da qual a velocidade de internalização diminui acentuadamente. As soluções de metocel com concentração de metocel superior a 1,25% possuem uma aparente viscosidade próxima de, e potencialmente excedendo, a do citosol celular (Figura 1), pelo menos no intervalo de tensões de cisalhamento relevantes para RME. De acordo com a Figura 1, o aumento da concentração de metocel conduz a um aumento na viscosidade do fluido extracelular (a uma tensão aplicada fixa). Isto significa que a diferença entre a viscosidade intracelular e extracelular diminui à medida que a concentração de metocel é aumentada para além de 1,25%. À medida que a diferença entre a viscosidade intracelular e extracelular diminui, a velocidade inicial da membrana para o citosol aumenta, coincidindo com uma maior velocidade de endocitose. Este comportamento é mostrado na Figura 2 até uma concentração de metocel de 1,7%. Aumentando as concentrações de metocel acima de 1,7% conduz a viscosidades extracelulares que excedem a viscosidade intracelular. Concomitantemente, à medida que a diferença nas viscosidades aumenta, a velocidade de endocitose diminui. Tal como mostrado na Figura 2, concentrações de metocel acima de 1,7% causam uma diminuição na velocidade de endocitose. Esta diminuição é consistente com a teoria aqui apresentada.

Foram utilizadas células CHO para determinar se o comportamento previsto ocorreria noutras linhas celulares. Protocolos semelhantes foram utilizados para a determinação do estado estacionário In/Sur com as células CHO tal como com as células K562. A endocitose foi estudada nas células CHO tanto com células aderentes a uma superfície sólida como em suspensão. De acordo com a Figura 3, In/Sur aumenta com a concentração de metocel até uma concentração de metocel de 1,25% para as células aderentes ( $p=0,0011$ ), e 1,5% para as células suspensas ( $p=0,0148$ ). Além destas concentrações, uma diminuição da velocidade de internalização é observada tanto para as células aderentes ( $p=0,0146$ ) como para as suspensas ( $p=0,0872$ ). As possíveis fontes de desvio nas tendências de In/Sur entre as células CHO aderentes e suspensas, bem como

entre as linhas celulares CHO e K562, incluem variações na viscosidade celular aparente, tensão da membrana celular e área membranar exposta. Por exemplo, mostrou-se que a disseminação celular aumenta a tensão intracelular [Want, N. e Ingber, D.E. 1994 *Biophys. J.* 66: 2181-2189]. Este efeito pode ter um papel nas velocidades de internalização mais baixas observadas na Figura 3 para as células CHO aderentes. O facto de cada uma das linhas celulares estudadas exibir uma assinatura de subida na internalização de Tf com a concentração crescente de metocel, seguida de uma diminuição para além de uma concentração de metocel coincidente com uma viscosidade extracelular aparente próxima da esperada para o citosol celular, é consistente com a teoria aqui apresentada.

### **Exemplo 2: Hidrogéis Viscosos com Viscosidade Óptima para Distribuição Vaginal de Leuprolide a Ovelhas**

Uma composição incluindo metilcelulose (metocel) e leuprolide, que se liga especificamente a receptores de LHRH do epitélio vaginal, foi administrada à vagina de ovelhas para demonstrar a utilidade de hidrogéis viscosos com propriedades reológicas escolhidas de modo óptimo para melhorar dramaticamente a distribuição de agentes bioactivos através dos epitélios dos mamíferos.

As concentrações do hidrogel foram seleccionadas como 1,5% e 1,75% uma vez que, tal como se pode observar a partir da Figura 1, a viscosidade aparente dos metocels está no intervalo entre 2 e 200 ou mais Poise no intervalo de tensão aplicada de entre 1 e 100 Pascals. O leuprolide foi misturado nos hidrogéis a uma concentração de 20 µg/ml. As ovelhas foram tratadas com um total de 100 µg de leuprolide. Cada tratamento causou um aumento significativo em LH, tal como mostrado na Figura 4. Para demonstrar que a distribuição de leuprolide é aumentada utilizando os metocels reologicamente otimizados, foram realizadas experiências de controlo utilizando a mesma dose (100 µg de leuprolide) administrada à vagina de ovelhas em solução salina tamponada com fosfato (metocel 0,0).

Os resultados deste estudo de comparação são mostrados na Figura 5. Os resultados demonstram que a administração de

uma única dose de leuprolide num hidrogel reologicamente otimizado podia ser utilizada para regular o desenvolvimento folicular em humanos e animais. Seria esperado que a administração diária repetida inibisse a função dos ovários.

### **Exemplo 3: Administração Intranasal de Análogos da Hormona Libertadora da Gonadotrofina ("GnRH")**

Um análogo de GnRH foi administrado intranasalmente a ovelhas utilizando uma solução altamente viscosa para demonstrar a generalidade das composições e métodos aqui apresentados para distribuição de macromoléculas através de barreiras epiteliais de mamífero. Uma cânula umbilical de linha azul foi inserida na narina das ovelhas até uma profundidade predefinida de 10 cm antes da distribuição de uma solução de metocel a 1,5% (5 ml de solução, contendo 100 µg de análogo de GnRH) a partir de uma seringa. A concentração sérica de LH foi monitorizada em função do tempo após a administração. Os resultados deste estudo são mostrados na Figura 6. Foi obtida uma concentração sérica terapeuticamente eficaz de LH, que é comparável à obtida através de injeção, reflectindo a capacidade das composições e dos métodos aqui descritos para aumentar o transporte transcelular de um análogo de GnRH. Quando foi administrado um controlo de 5 ml de solução salina contendo 100 µg, a concentração sérica de LH foi virtualmente indetectável.

### **Exemplo 4: Comparação da Distribuição Intravaginal e Distribuição Intravenosa de Vasopressina a Ovelhas**

Ao contrário de leuprolide, a vasopressina (apesar do peso molecular ser semelhante ao do leuprolide) não se liga a receptores da superfície celular do epitélio vaginal. Consequentemente, vasopressina (ADH) foi administrada intravaginalmente a ovelhas para determinar se a ligação do composto a distribuir a um receptor tinha um efeito na distribuição intracelular. A distribuição eficaz de vasopressina foi medida através da determinação do nível sistémico de cortisol.

Tal como mostrado na Figura 7, não houve virtualmente diferença nos níveis sistémicos de cortisol após a

administração de um controlo (uma solução aquosa que não continha metocel nem vasopressina) relativamente a quando foram distribuídos 200 µg de vasopressina intravaginalmente em soluções de metocel a 1,5 ou 1,75%. Por comparação, a administração sistémica de vasopressina (administração IV) mostrou maiores níveis de cortisol. Este exemplo demonstra a importância da ligação ao receptor para o sucesso do método.

Lisboa, 2011-07-07

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para administração de hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH) ou um análogo de GnRH intracelularmente a uma célula, compreendendo:

um hidrogel biocompatível, e

GnRH ou um análogo de GnRH;

caracterizada pela composição ter uma viscosidade aparente de entre 10 e 200 Poise (entre 1 e 20  $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$ ) quando medida utilizando um reómetro de tensão controlada a 37°C utilizando uma geometria de cone e prato a um intervalo de tensão aplicada de entre 1 e 100 Pascals.

2. Composição de acordo com a Reivindicação 1 em que a célula é uma célula eucariótica.

3. Composição de acordo com a Reivindicação 2 em que a célula é uma célula de mamífero, de preferência um humano.

4. Composição de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-3 em que a célula é uma célula da vagina, do recto, do nariz, do olho, do ouvido, da boca, dos pulmões, ou da pele.

5. Composição da Reivindicação 1 em que a viscosidade aparente da composição está entre 50 e 200 Poise (entre 5 e 20  $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$ ).

6. Composição da Reivindicação 1 em que o hidrogel compreende uma celulose, óxido de polialquileno, polivinilpirrolidona, dextrano, alginato, agarose, gelatina, ácido hialurónico, trealose, álcool polivinílico, copolímeros e misturas destes, poliacrilamida, polifosfazina, poliacrilato ou copolímero de blocos de óxido de polialquileno.

7. Composição da Reivindicação 1 em que o hidrogel compreende um polissacárido, uma proteína ou um polímero sintético.

8. Composição da Reivindicação 7 em que o polissacárido é uma celulose, um dextrano ou um alginato.



9. Composição da Reivindicação 8 em que a celulose é metilcelulose.

10. Composição da Reivindicação 9 compreendendo metilcelulose numa concentração de 1,25 a 1,8% (p/p).

11. Composição de qualquer uma das Reivindicações 1-10 para utilizar em medicina.

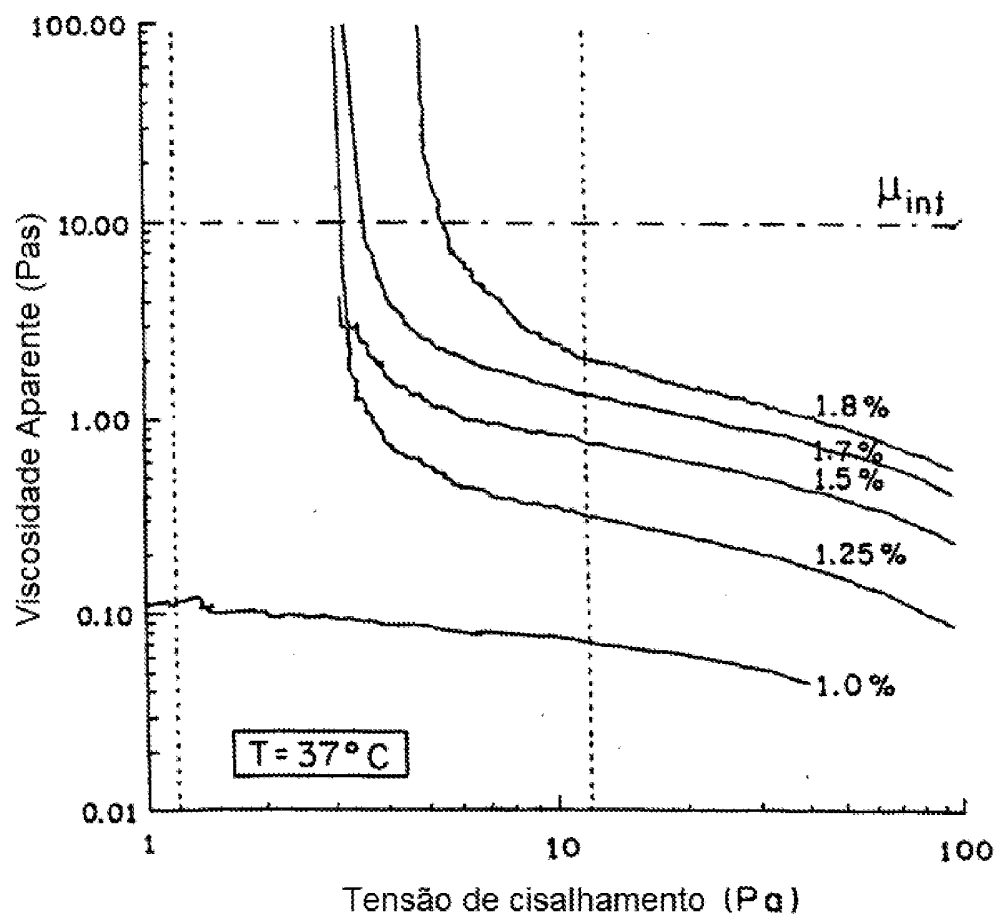
12. Utilização da composição de qualquer uma das Reivindicações 1-10 na preparação de um medicamento para distribuição de agentes a células.

13. Utilização da Reivindicação 12 em que a célula à qual o agente será distribuído está no nariz, na vagina, no recto, no olho, no ouvido, na boca, nos pulmões ou na pele.

14. Método para distribuição de GnRH ou de um análogo de GnRH a células *in vitro* compreendendo a administração às células de uma composição de qualquer uma das Reivindicações 1-10.

15. Composição tal como reivindicada em qualquer uma das Reivindicações 1 a 10 compreendendo ainda um agente de superfície activa biocompatível.

Lisboa, 2011-07-07

FIGURA 1

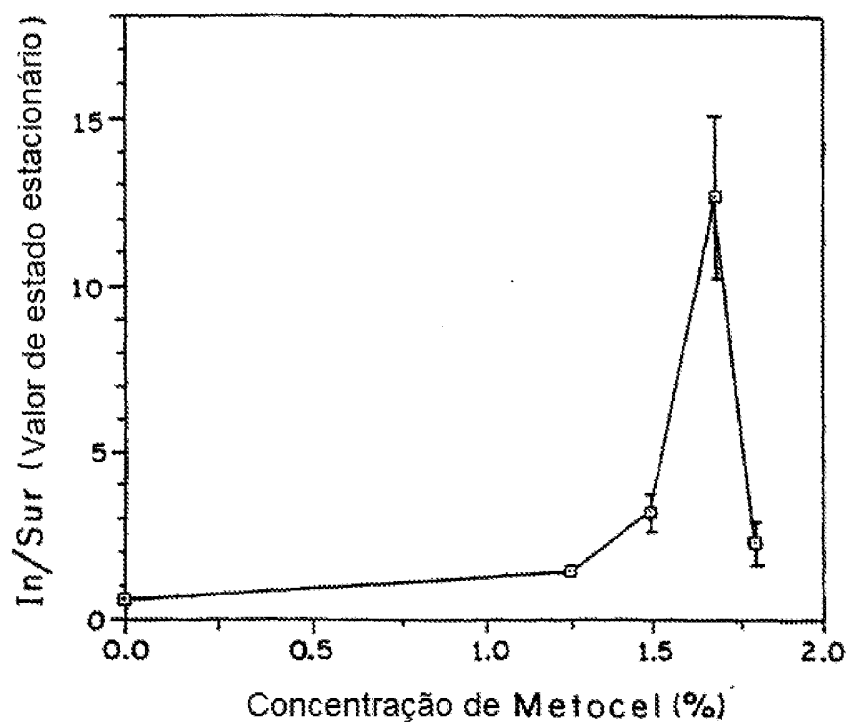


FIGURA 2.

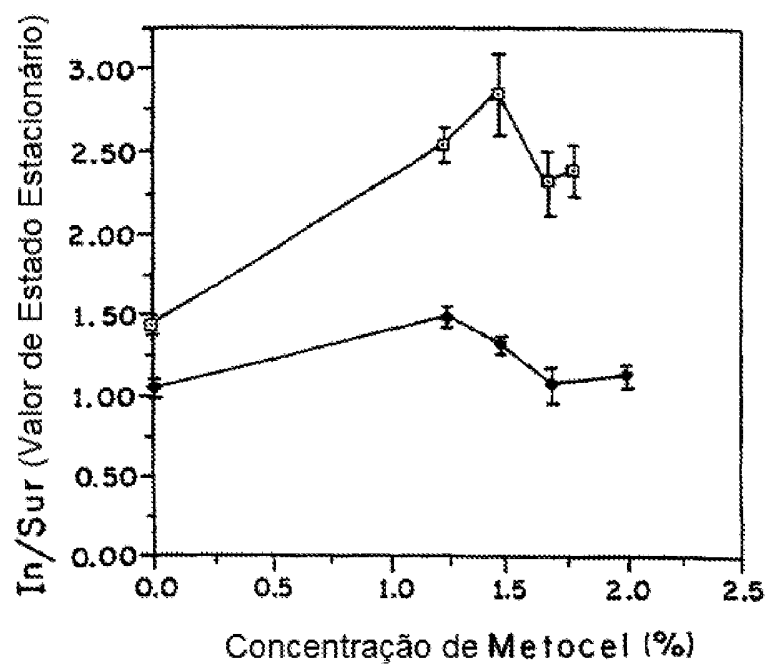


FIGURA 3

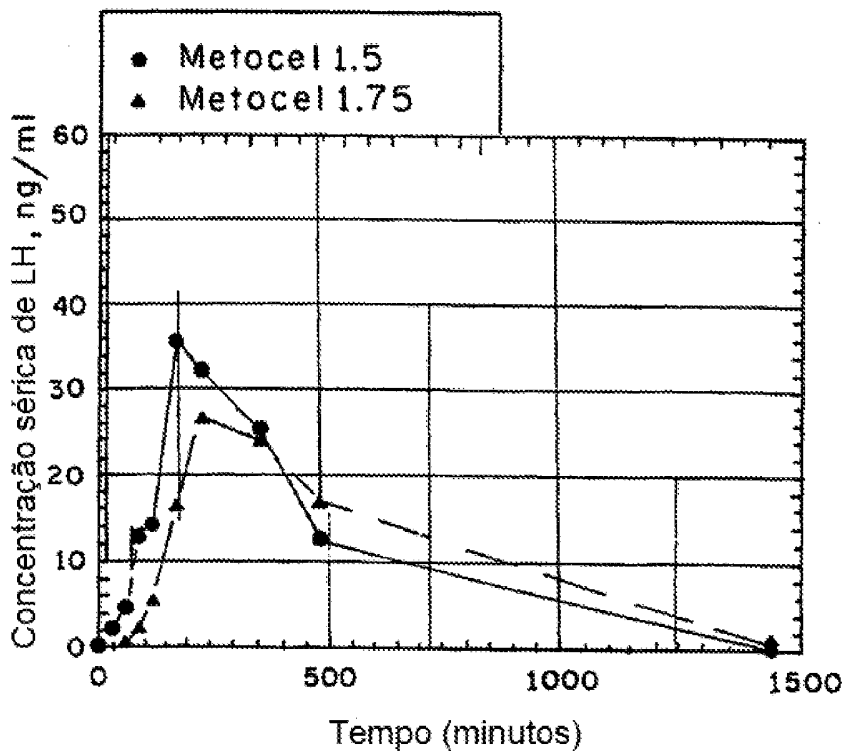


FIGURA 4

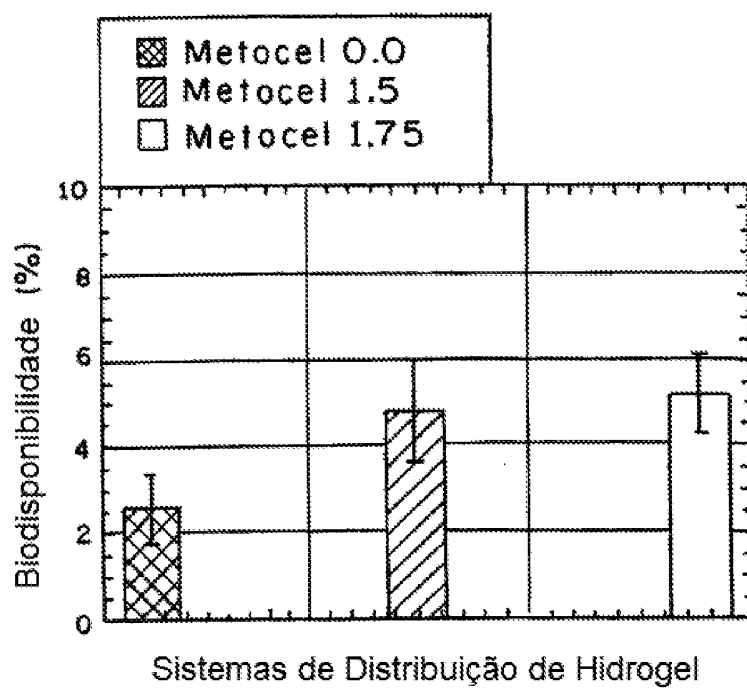


FIGURA 5

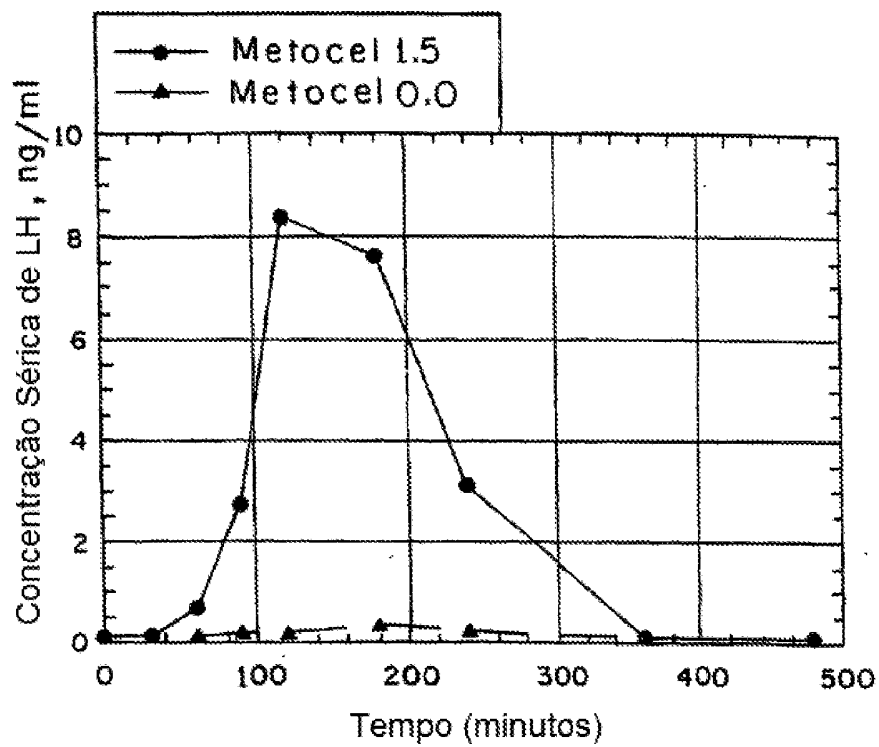


FIGURA 6

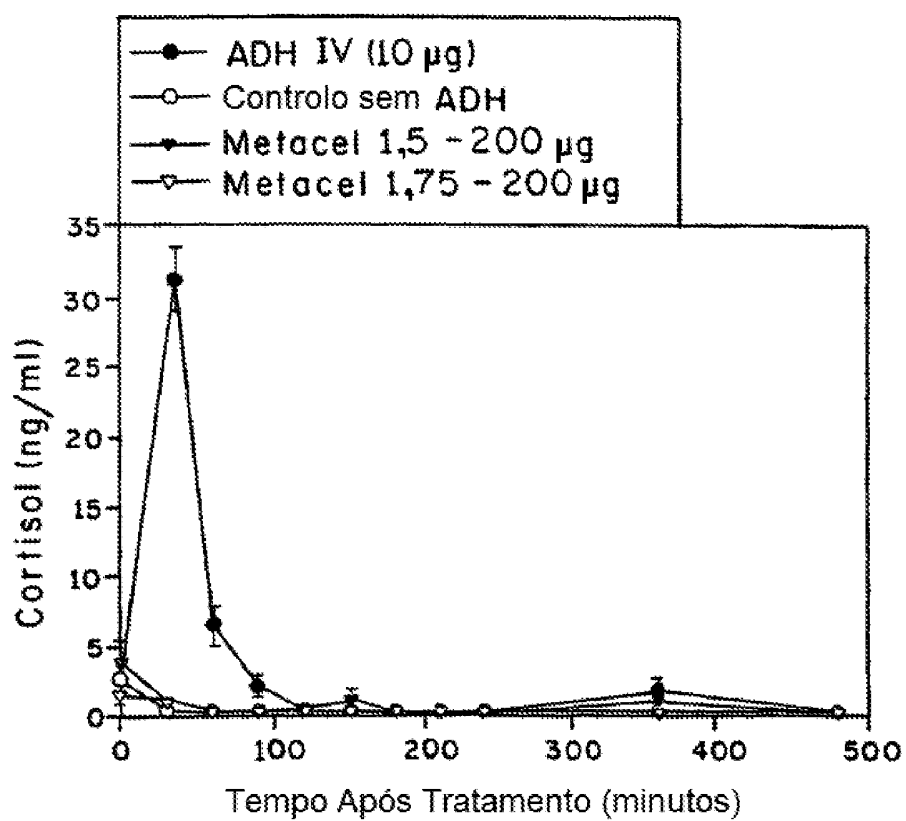


FIGURA 7