



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102012010577-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102012010577-2

(22) Data do Depósito: 04/05/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 01/04/2014

(51) Classificação Internacional: A61K 31/555; A61K 9/51; A61K 47/30; A61P 35/00.

(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO FTALOCINANINA DE ÍNDIO ENCAPSULADA EM NANOESFERAS DE UM POLÍMERO E SEU PROCESSO DE PREPARO COM CONTROLE DAS PROPRIEDADES NANOPARTICULADAS

(73) Titular: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO ESPÍRITO SANTO - IFES. CGC/CPF: 10838653000106. Endereço: Av. Rio Branco, 50, Santa Lúcia, Vitória, ES, BRASIL(BR), 29056-255

(72) Inventor: ANDRÉ ROMERO DA SILVA; CARLOS AUGUSTO ZANONI SOUTO.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 04/05/2012, observadas as condições legais

Expedida em: 08/06/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



RELATÓRIO DESCRITIVO DA PATENTE DE INVENÇÃO

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO FTALOCIANINA DE
ÍNDIO ENCAPSULADA EM NANOESFERAS DE UM POLÍMERO E SEU
5 PROCESSO DE PREPARO COM CONTROLE DAS PROPRIEDADES
NANOPARTICULADAS”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção tem como principal alvo a composição medicamentosa a base
10 de In-ftalocianina (InPc) encapsulado em nanoesferas do copolímero do ácido láctico-
co-ácido glicólico ligado a moléculas de polietileno glicol (PLGA-PEG), para aplicação
em terapia fotodinâmica nos tratamentos de doenças oncológicas via administração
intravenosa. A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês: *photodynamic therapy*) é uma
15 modalidade terapêutica que vem sendo utilizada no tratamento do câncer, bem como em
outras doenças não oncológicas causadas por vírus, bactérias ou fungos.

A invenção também compreende o processo de preparo de nanoesferas de PLGA-
PEG contendo InPc com controle das propriedades nanoparticuladas a partir da
compreensão da influência dos parâmetros envolvidos no preparo das nanoesferas
através de um planejamento fatorial. Este planejamento é caracterizado pela realização
20 sistemática de experimentos visando a otimização de formulações a partir do
conhecimento dos efeitos individuais e combinatórios dos parâmetros do processo sobre
as propriedades do sistema carreador.

TÉCNICAS RELACIONADAS

25 As últimas décadas foram caracterizadas pela evolução no tratamento do câncer
devido à descoberta de novos quimioterápicos, a associação de terapias padrões
(cirurgia, radioterapia e quimioterapia) e o surgimento de novas terapias como a
hormonioterapia e a imunoterapia. Os avanços da oncologia têm aumentado o tempo de
vida dos pacientes e reduzido os efeitos colaterais do tratamento medicamentoso como
30 alopecia (queda de cabelo), alterações gastrintestinais (náuseas, vômitos e diarreias) e
adinamia (prostração física). Embora avanços tenham ocorrido, os efeitos colaterais
ainda persistem e não são raros os casos onde a medicina não tem estratégia definida
para tratamento de alguns tipos de câncer. Um exemplo é o carcinoma de células

pequenas da bexiga, um tumor agressivo descoberto desde 1981 que não apresenta estratégia definida para tratamento e que leva os pacientes a terem sobrevida média de 5 a 6,5 meses (Church, D. N. Et al. Clinical review-small cell carcinoma of the bladder, *Cancer Treat. Rev.* 32, 588-593, 2006). Quando se pensa em neoplasias em estágio avançado, os prognósticos são ainda piores. Um exemplo é a disseminação peritoneal oriunda de tumores gastrointestinais a qual não apresenta tratamento padrão e para a qual a quimioterapia sistêmica não apresenta efeito significativo, devido ao baixo fluxo sanguíneo no peritônio, fato que leva os pacientes a resistirem por apenas 3 meses (Sadeghi, B. Et al. Peritoneal carcinomatosis from nongynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study, *Cancer* 88, 358-363, 2000).

Diante destes fatos, novas técnicas de tratamento vêm sendo estudadas e entre elas se destaca a PDT a qual é uma modalidade terapêutica que vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de carcinoma basocelular (câncer de pele mais freqüente) (Fantini, F. Et al. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: clinical and pathological determinants of response, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 25, 896-901, 2011), bem como em outras doenças não oncológicas como no tratamento da degeneração macular (doença que causa perda da visão) (Das, R. A. Et al. Combined treatment modalities for age related macular degeneration, *Curr. Drug Targets* 12, 182-189, 2011), papiloma vírus (Raish, M. et al. Photodynamic therapy in combination with Green tea polyphenol EGCC enhances antitumor efficacy in human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells, *J. Applied Res.* 10, 58-67, 2010) e em procedimentos oncológicas (Teissie, J. et al. Drug Delivery by electropulsation: recent developments in oncology, *Int. J. Pharm.* 423, 3-6, 2012). Além disso, a PDT também tem sido utilizada no tratamento de efluentes (Costa, L. Et al. Sewage bacteriophage inactivation by cationic porphyrins: influence of light parameters, *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 1126-1133, 2010), em sínteses químicas (Zeng, W. et al. Efficient dye-sensitized solar cells with an organic photosensitizer featuring orderly conjugated ethylenedioxythiophene and dithienosilole blocks, *Chem. Mater.* 22, 1915-1925, 2010), na esterilização de sangue (Wainwright, W. The emerging chemistry of blood product disinfection, *Chem. Soc. Rev.* 31, 128-136, 2002) e na exterminação de pragas agrícolas (Aver'yanov, A. A., Suppression of cucurbit scab on cucumber leaves by photodynamic dyes, *Crop protection* 30, 925-930, 2011).

Na oncologia, a PDT está baseada na administração sistêmica de um fotossensibilizador (PS) que se acumula preferencialmente nos tecidos doentes em razão

da formação de complexos intravasculares entre as substâncias fotossensíveis e lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês low density lipoprotein). Como a maioria das células tumorais apresenta uma superexpressão de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês low density lipoprotein) (em
5 comparação às células normais), há um acúmulo preferencial dos fotossensibilizadores sobre o tecido tumoral, de maneira que tem sido aceito que a seletividade tumoral aumenta com o caráter lipofílico do agente fotossensibilizante. (Simplicio, F. I. Et al. Photodynamic therapy: pharmacological aspects, applications and news from medications development, *Quím. Nova* 25, 801-807, 2002). Entretanto, nem todos os
10 tumores apresentam elevada concentração de receptores LDL e, neste caso, o fotossensibilizador pode se ligar a lipoproteínas de alta densidade (HDL) e albumina, fato que permite a retenção do fotossensibilizador no estroma tumoral ("arquitetura" de suporte de tecido conectivo e aporte vascular) sem o intermédio de receptores (Stylli, S. S. Et al. Photodynamic therapy of cerebral glioma – A review. Part I – A biological basis. *J. Clin. Neurosci.* 13, 615-625, 2006). O tumor é então irradiado utilizando-se
15 uma fonte de luz na região do vermelho ou infravermelho próximo (600-800 nm), a fim que a radiação penetre efetivamente nos tecidos tumorais. A irradiação do tumor provoca a excitação do fotossensibilizador a um estado eletrônico de maior energia (estado eletrônico singlete excitado) (Juzeniene, A. Et al. Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology* 25, 7-28, 2006). O fotossensibilizador neste estado eletrônico sofre uma
20 transição para o estado triplete excitado (estado eletrônico de menor energia). Neste estado energético, o fotossensibilizador pode interagir fotoquimicamente com moléculas de oxigênio, ou biomoléculas localizadas próximas à região irradiada, gerando espécies reativas como o oxigênio singlete que danificam o tumor irradiado (Juzeniene, A. Et al. 2006). Como o tempo de vida do oxigênio singlete é curto (10-40 ns) em sistemas biológicos e, assumindo a mesma constante de difusão do oxigênio singlete como para o oxigênio molecular em células, o raio de ação do oxigênio singlete é de apenas 10-20
25 nm (Moan, J. Et al. Action spectra of phthalocyanines with respect to photosensitization of cells. *Photochem. Photobiol.* 56, 171-175, 1992). Portanto, a destruição causada pelo efeito fotodinâmico ocorre próximo ao local de geração primária do oxigênio singlete na célula. Sendo assim, somente as estruturas celulares próximas às regiões com alta
30 concentração do fotossensibilizador, e que forem irradiadas, é que serão destruídas pela PDT.

A eficiência da PDT depende de várias propriedades fisiológicas, fotofísicas e físico-químicas, como a retenção seletiva do fotossensibilizador por unidade de volume de tecido e o efeito da hidrofobicidade do fotossensibilizador sob a atividade biológica (Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photoch. Photobiol. B-Biol.* 39, 1-18, 1997). Pesquisadores têm mostrado que a retenção de fotossensibilizadores em células tumorais aumenta quando a polaridade da molécula diminui (Nelson, J. S. Et al. Study of the in vivo and in vitro photosensitizing capabilities of uroporphyrin I compared to Photofrin II, *Lasers Surg. Med.* 6, 131-136, 1986). Contudo, se a lipofilicidade é muito alta, pode-se dificultar a administração intravenosa destas substâncias.

Para resolver o problema dos compostos hidrofóbicos e aumentar a especificidade dos compostos fotossensíveis, pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de diferentes estratégias de liberação envolvendo lipossomas, nanopartículas lipídicas, micelas poliméricas, dendrímeros, pontos quânticos, nanotubos e nanopartículas poliméricas. Por este motivo, os pesquisadores desenvolveram os carreadores "Stealth" (marca registrada pela Liposome Technology Inc.) os quais são lipossomas, caracterizados por apresentarem maior tempo de permanência na corrente sanguínea devido as modificações realizadas na sua superfície pela ligação de polietileno glicol. No entanto, estes lipossomas podem apresentar efeitos colaterais como o da síndrome da mão e do pé (caracterizada pelo vazamento do fármaco encapsulado pelas mãos e pelos pés causando eritemas e hipersensibilidade), havendo a necessidade de administração de anti-histamínicos e antiinflamatórios (Gordon, A. N. Et al. Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin vs. Topotecan, *J. Clin. Oncol.* 19, 3312-3322, 2001). Os lipossomas convencionais (não Stealth) apresentam limitações maiores devido ao curto tempo de estocagem e a instabilidade química e física em ambientes biológicos, o que torna a sua utilização menos apreciável na encapsulação dos fotossensibilizadores (Vargas, A. Et al. Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an in vivo evaluation using chick embryos, *Int. J. Pharm.* 286, 131-145, 2004).

Sistemas micelares também podem ser usados como veículos para fotossensibilizadores hidrofóbicos, contudo os agentes emulsificantes empregados como Cremophor-EL podem causar hipersensibilidade e reações anafiláticas *in vivo* (Gelderblom, H. Et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicles selection for drug formulation, *Eur. J. Cancer* 37, 1590-1598, 2001). Embora os

dendrímeros possam aumentar a eficiência fotodinâmica dos fotossensibilizadores, deve-se ressaltar que dendrímeros com ramificações altamente regulares, de massa molar única e com números de grupos periféricos bem definidos, são obtidos por síntese gradativa. Tal fato envolve um trabalho excessivo que acaba encarecendo o produto final (Gillies, E. R. Et al. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discov. Today* 10, 35-43, 2005).

Carreadores como pontos quânticos e nanopartículas inorgânicas como as de prata, ouro e sílica têm mostrado efeitos fotodinâmicos interessantes, e embora sejam carreadores biocompatíveis, não são biodegradáveis havendo possibilidade de acúmulo das mesmas no organismo, bem como, de severa toxicidade (Goodman, C. M. Et al. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains, *Bioconjugate Chem.* 15, 897-900, 2004; Buzea, C. et al. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity, *Biointerphases* 2, MR17-MR71, 2007). Nanopartículas lipídicas embora tenham despertado o interesse de muito pesquisadores devido aos resultados positivos como carreadores, podem apresentar capacidade limitada de carregamento de fármacos, dificuldade no ajuste do perfil de liberação do fármaco e liberação do fármaco durante o período de estocagem (Muller, R. H. Et al. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, *Int. J. Pharm.* 242, 121-128, 2002).

Nanopartículas poliméricas oferecem numerosas vantagens sobre os sistemas carreadores de fármacos, tais como alta capacidade de encapsulação de fotossensibilizadores, possibilidade de curtos e longos períodos de liberação do fármaco no organismo, uma larga variedade de materiais quem podem ser utilizados e também a possibilidade de reduzir os efeitos colaterais dos medicamentos. O PLGA é um dos polímeros mais utilizados no preparo de partículas poliméricas devido ser um polímero biodegradável, biocompatível e por possuir aprovação da FDA para uso em clínica humana. No entanto, nanopartículas de PLGA quando presentes no sistema circulatório são facilmente identificadas pelas opsoninas que sinalizam aos macrófagos eliminando rapidamente as nanopartículas do nosso organismo. Entretanto, a ligação de moléculas de polietileno glicol às moléculas de PLGA permite que as nanoesferas permaneçam por mais tempo na corrente sanguínea do que esferas de PLGA não modificadas (Mosqueira, V. C. Et al, Biodistribution of long-circulating PEG-Grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density, *Pharm. Res.* 18, 1411-1419, 2001).

A preparação de uma formulação carreadora de fármaco envolve uma série de variáveis. Por décadas, a tarefa de otimização das formulações farmacêuticas está associada ao trabalho univariado de tentativa e erro. Usando esta metodologia, a solução de problemas específicos com as formulações pode ser obtida, mas a composição ótima nem sempre é atingida. Em geral, métodos univariados podem melhorar uma característica em detrimento de outra, fato que pode tornar dispendioso e caro a otimização das formulações (Singh, B. Et al. Optimizing drug delivery systems using systematic "design of experiments." Part I. Fundamental aspects, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 22, 27-105, 2005). No entanto, o emprego de planejamento sistemático dos experimentos para otimizar as formulações de sistemas carreadores pode resolver os problemas acima expostos. Esta sistemática torna-se mais vantajosa devido ao menor número de experimentos necessários para se atingir a formulação ótima, permite solucionar problemas de preparo das formulações mais facilmente, revela interações (efeitos sinérgicos ou antagônicos) entre variáveis do processo e permite controlar o processo de obtenção dos sistemas carreadores em razão da ampla compreensão da influência das variáveis de processo sobre as propriedades destes carreadores (Singh, B. Et al. 2005).

Fotossensibilizadores convencionais hidrofóbicos são sub-utilizados na terapia fotodinâmica devido a algumas propriedades que estes apresentam em ambientes aquosos. Uma delas está relacionada à redução da capacidade do fotossensibilizador hidrofóbico de se associar às membranas ou de ser internalizado pelas células (fatos importantes que reduzem a eficiência fotodinâmica do fotossensibilizador) devido a formação de agregados ou microcristais, que diminuem a cinética de associação do fotossensibilizador (Silva, A. R. Et al. In vitro photodynamic activity of chloro(5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato)indium(III) loaded- poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles in LNCaP prostate tumour cells. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 94, 101-112, 2009). Além disso, o aumento da lipofilicidade (hidrofobicidade) dos compostos fotossensíveis dificulta a geração do oxigênio singlete em meio aquoso devido a formação de agregados (Fernandez, D. A. Photophysical and aggregation studies of t-butyl-substituted Zn phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 63, 784-792, 1996).

A finalidade do fotossensibilizador é de transferir energia (após ser excitado a um nível eletrônico de maior energia através de uma fonte de radiação) para as moléculas de oxigênio molecular. As moléculas de oxigênio molecular ao receberem esta energia,

passam a um estado conhecido como singlete. O oxigênio singlete é um estado excitado do oxigênio muito reativo e citotóxico às células, levando à morte as células onde o fotossensibilizador estiver localizado (Juzeniene, A. et al 2006). Em outro mecanismo, o fotossensibilizador pode transferir cargas à biomoléculas ou mesmo ao oxigênio, gerando espécies radicalares que também são citotóxicas. No entanto, geralmente, o oxigênio singlete é sempre o responsável pela morte das células cancerígenas, e para que se possa gerá-lo é necessário o fotossensibilizador. Deve-se ressaltar que os fotossensibilizadores hidrofóbicos tendem a se localizar nas células cancerígenas devido a estes compostos formarem complexos com LDL. Estes complexos tendem a se concentrar nas células cancerígenas devido a superexpressão de receptores de LDL nestas células doentes.

Após a administração de fotossensibilizadores e do tempo necessário para o fármaco ser distribuído no organismo, o médico localiza o tumor através de uma microcâmera, e através de uma fibra ótica irradia a região doente, sem haver necessidade de grandes incisões. Isso facilita a recuperação dos enfermos, assim como, torna o procedimento médico mais simples. Também é possível acompanhar a distribuição do fotossensibilizador no tecido doente através de medidas de fluorescência do fotossensibilizador. Existem fluorímetros que captam sinais fluorescentes emitidos por tecidos. São aparelhos muito sensíveis que permitem uma maior segurança no momento da irradiação.

As ftalocianinas (PC) são uma classe interessante de compostos que exibem tanto estabilidade química como física, e possuem um macrociclo que pode envolver a maioria dos íons metálicos em sua cavidade, os chamados complexos metaloftalocianínicos. Estes compostos revelaram-se altamente promissores como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica, devido a intensa absorção da luz visível na região do vermelho (Durmus, M. A. Et al. The synthesis and photophysical and photochemical properties of aryloxy tetra-substituted gallium and indium phthalocyanine derivatives, *Tetrahedron* 63, 1385-1394, 2007). Conseqüentemente, a presença de átomos pesados (como In) na estrutura do fotossensibilizador favorece a

geração de oxigênio singlete. Fotossensibilizadores contendo índio mostram excelente capacidade em gerar oxigênio singlete (Silva, A. R. Et al. Photodynamic activity of chloro(5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato) indium (III), *J. Braz. Chem. Soc.* 19, 491-501, 2008), como é o caso da ftalocianina de índio (InPc).

5 Na PDT sempre haverá necessidade de um fotossensibilizador, um composto que quando administrado via intravenosa, ou tópico, deve ser iluminado em geral na faixa de comprimento de onda 600-800 nm (faixa em que a penetração da luz na pele é mais intensa) (Juzeniene, A. Et al. 2006). Quando iluminado, o composto absorve energia e é excitado a níveis energéticos permitindo que estes troquem (transfiram) energia com o
10 oxigênio molecular, gerando o oxigênio singlete que é citotóxico. Logo, este fotossensibilizador é de essencial necessidade para a terapia.

Um processo de síntese de In-ftalocianina é mencionado na patente US5405954A. Entretanto, o referido documento não cita a encapsulação deste fotossensibilizador para aplicação no tratamento de doenças.

15 Ainda, a patente US7682762B2 refere-se ao processo de preparo de nanocristais de In-ftalocianina com diâmetros médios de 0,5 a 20 nm. Mas a referida patente não reivindica o direito sobre formulações nanoparticuladas ou sobre formulações de liberação controlada.

A patente PI0610200-0A2 reivindica um granulado encapsulado de um derivado
20 ftalocianínico metalado solúvel em água onde os grânulos de ftalocianina são revestidos pela pulverização de uma camada de encapsulação, fato que não condiz com as nanoesferas de PLGA-PEG contendo In-ftalocianina (fotossensibilizador hidrofóbico insolúvel em água) reivindicados nesta patente.

Ainda a patente PI0905627-0A2 reivindica a composição farmacêutica de
25 nanocápsulas do polímero de ácido lático ligado a moléculas de polietileno glicol (PLA-PEG) contendo AL-ftalocianina, mas não cita o preparo de nanoesferas de PLGA-PEG contendo In-ftalocianina.

A patente US5686439 reivindica o uso de um derivado ftalocianínico metalado preferencialmente de alumínio e rutênio, mas pode compreender índio, assim como uma
30 composição farmacêutica compreendendo este fotossensibilizador e um condutor farmacêutico. No entanto, a estrutura da substância reivindicada não coincide com a estrutura da ftalocianina de índio, assim como não se foi reivindicado o direito sobre uma composição farmacêutica nanoparticulada ou de liberação controlada. Não há qualquer citação a respeito do processo de preparo desta composição que permita o

controle das propriedades da formulação farmacêutica, diferente portanto da invenção descrita neste documento.

5 A invenção WO 97/10811 reivindica uma composição farmacêutica nanoparticulada preparada a partir do copolímero PLGA ou seus monômeros, contendo ftalocianina de zinco. A patente não reivindica direitos sobre composição farmacêutica que contenha ftalocianina de índio ou um polímero biodegradável ligado a moléculas de PEG. Além disso, o processo de preparo das nanoesferas da invenção WO 97/10811 não contempla o controle das propriedades nanoparticuladas como tamanho, eficiência de encapsulação do fotossensibilizador, eficiência de recuperação e quantidade residual de emulsificante
10 como está sendo reivindicado nesta invenção.

O pedido de patente US 2009/0155177 A1 reivindica o direito sobre novos derivados ftalocianínicos de Zn, Al, Mg, Ga, Ge e Sn, os quais podem ser veiculados por carreadores farmacêuticos como lipossomas, nanocontainers e biopolímeros. No entanto, a invenção não reivindica o direito sobre uma composição farmacêutica que
15 compreenda a ftalocianina de índio, nem o preparo de nanoesferas a partir de polímeros PEGlados com controle das suas propriedades nanoparticuladas via planejamento fatorial. Já a patente US5484778 reivindica composições de novas ftalocianinas de Al, Ge, Ga, Sn e Si com ligantes axiais como aminas e amônio quaternário para uso em terapia fotodinâmica. Entretanto a patente não reivindica direitos sobre a ftalocianina de
20 índio nem sobre uma composição farmacêutica compreendendo carreadores nanoparticulados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

25 A presente invenção refere-se a uma composição para o tratamento de câncer via terapia fotodinâmica, à base de ftalocianina de índio (InPc), que é um fotossensibilizador hidrofóbico, encapsulado em nanoesferas de PLGA-PEG com diâmetros inferiores a 200 nm e de circulação sanguínea prolongada, visando o tratamento de doenças oncológicas via administração intravenosa seguida por irradiação da área doente, o qual é provido de características intrínsecas que conferem o diferencial
30 entre o referido tratamento ora proposto e os demais tratamentos conhecidos na técnica..

Mais especificamente, a referida invenção refere-se uma composição para o tratamento de doenças oncológicas, bem como outras doenças não oncológicas causadas por vírus, bactérias ou fungos.

A invenção ainda compreende o processo de preparo das nanoesferas de PLGA-PEG contendo InPc com controle das propriedades nanoparticuladas tais como o tamanho da nanopartícula, a eficiência de encapsulação do InPc, a eficiência de recuperação das nanoesferas e a porcentagem residual do agente emulsificante a partir da compreensão da influência da concentração do estabilizante coloidal, da presença de um solvente orgânico polar na fase aquosa e da proporção entre as fases orgânica/aquosa no preparo das nanoesferas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

10

Figura 1 – Estrutura da ftalocianina de índio (InPc)

15

Figura 2 – Fotoxidação de células MCF-7 na presença de 7,5 $\mu\text{mol/L}$ de InPc (A) encapsulado e (B) não encapsulado em nanoesferas de PLGA-PEG após 2 horas de incubação, dose de irradiação de 7,5 J/cm^2 e potências variadas. Dados representativos de quatro experimentos independentes. (*) Redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle (células) com 95% de confiança.

20

Figura 3 – Micrografia confocal de células MCF-7 incubadas por 2 horas com (A) nanoesferas contendo InPc ou com (B) soluções de InPc livre na concentração de 7,5 $\mu\text{mol/L}$. (a) micrografias associadas a fluorescência do InPc, (b) micrografia relacionada a fluorescência do DAPI que se liga ao DNA para marcação do núcleo, (c) micrografias relacionadas a fluorescência da faloidina ligada a F-actina para marcação do citoesqueleto, e (d) combinação das micrografias relacionadas a fluorescência dos três compostos fluorescentes (faloidina, DAPI e InPc).

25

30

Figura 4 - Espectro de absorvância da solução 5 $\mu\text{mol/L}$ de InPc livre solubilizado em 1-metil-2-pirrolidona ou em meio aquoso contendo 3% de MP e 0,03% de Tween 20, e de InPc encapsulado em nanopartículas de PLGA-PEG disperso em água contendo ou não 0,03% de Tween 20. Para melhor comparação os espectros originais (A) de absorvância do InPc encapsulado foram (B) tratados usando o software Origin 6.0 para eliminar o efeito do espalhamento causado pela partículas a fim permitir uma comparação das intensidades de absorvância entre os espectros.

Figura 5 – Gráfico da absorvância relativa de soluções 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de (A) InPc livre solubilizado em 1-metil-2-pirrolidona e (B) de InPc encapsulado em nanopartículas de PLGA-PEG dispersas em água. As soluções foram irradiadas com um laser de diodo de 665 nm, variando-se a potência entre 0,04-55 mW, por 10 doses de irradiação de 0,5 J/cm².

Figura 6 – Cortes ópticos transversais com aumento gradual de 0,46 μm de profundidade para uma micropartículas de PLGA-PEG contendo InPc encapsulado obtidos por microscopia confocal. Micropartículas foram preparadas para que fosse possível avaliar a distribuição do InPc dentro das esferas via microscopia confocal.

Figura 7 – Micrografia confocal de micropartículas contendo (A) o InPc localizado mais próximo a superfície da microesfera e (B) distribuído mais homogeneamente pela partícula. Em ambas as figuras A e B há 3 micrografias sendo uma delas (a) referente à visualização da emissão de fluorescência do InPc excitado pelo laser de argônio, (b) a visualização da partícula sem excitação do InPc, e (c) a última que constitui uma soma das duas primeiras micrografias. Micropartículas foram preparadas para que fosse possível avaliar a distribuição do InPc dentro das esferas via microscopia confocal.

Figura 8 – Microscopia eletrônica da formulação otimizada de nanoesferas de PLGA-PEG contendo InPc com aumento de (a) 10000X e (b) 20000X.

Figura 9 – Valores dos efeitos principais e combinatórios dos fatores estudados (A = Proporção o/a, B = % etanol na fase aquosa, C = concentração de PVA) sobre a área integrada dos espectros de absorvância das suspensões de nanoesferas de PLGA-PEG contendo InPc conforme planejamento fatorial 2³. Os efeitos foram calculados através do software Statística 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 95% de confiança). O tamanho das esferas foi monitorado através dos espectros de absorvância das suspensões coloidais, sendo posteriormente, calculadas as respectivas áreas integradas, as quais foram consideradas como proporcionais a turbidez das suspensões. As suspensões caracterizadas pela presença de partículas de menor diâmetro devem apresentar espectros de absorvância com menor área integrada em razão das mesmas causarem menor espalhamento de luz.

Figura 10 – Valores dos efeitos principais e combinatórios dos fatores estudados (A = Proporção o/w, B = % etanol na fase aquosa, C = % de PVA) sobre a % de recuperação das nanoesferas de PLGA-PEG contendo InPc conforme planejamento fatorial 2^3 . Os contrastes foram calculados através do software Statística 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 95% de confiança)

Figura 11 – Valores dos efeitos principais e combinatórios dos fatores estudados (A = Proporção o/w, B = % etanol na fase aquosa, C = % de PVA) sobre a % de encapsulação do InPc em nanoesferas de PLGA-PEG conforme planejamento fatorial 2^3 . Os contrastes foram calculados através do software Statística 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 95% de confiança)

Figura 12 – Valores dos efeitos principais e combinatórios dos fatores estudados (A = Proporção o/w, B = % etanol na fase aquosa, C = % de PVA) sobre a o potencial zeta das nanoesferas de PLGA-PEG contendo InPc conforme planejamento fatorial 2^3 . Os contrastes foram calculados através do software Statística 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 95% de confiança)

Figura 13 – Valores dos efeitos principais e combinatórios dos fatores estudados (A = Proporção o/w, B = % etanol na fase aquosa, C = % de PVA) sobre a PVA residual das nanoesferas de PLGA-PEG contendo InPc conforme planejamento fatorial 2^3 . Os contrastes foram calculados através do software Statística 6.0. (* Resultados significativos obtidos com 95% de confiança)

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um composto a base de In(III)-ftalocianina encapsulado em nanoesferas do copolímero do ácido lático-co-ácido glicólico ligado a moléculas de polietileno glicol (PLGA-PEG), para aplicação em terapia fotodinâmica nos tratamentos de doenças oncológicas via administração intravenosa.

As ftalocianinas são uma classe interessante de compostos que exibem tanto estabilidade química como física, e possuem um macrociclo que pode envolver a maioria dos íons metálicos em sua cavidade, os chamados complexos metaloftalocianínicos. Estes compostos são altamente promissores como

fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica devido a intensa absorção da luz visível na região do vermelho. Ressalta-se que a introdução de certos átomos pesados na estrutura de uma molécula favorece a geração de oxigênio singlete devido ao aumento do acoplamento spin-órbita que favorece a transição do fotossensibilizador de um estado singlete excitado para um triplete excitado. Conseqüentemente, a presença de átomos pesados (como In) na estrutura da ftalocianina favorece a geração de oxigênio singlete (principal espécie citotóxica gerada na PDT). No entanto, as metaloftalocianinas convencionais, como o In(III)-ftalocianina (Figura 1), são compostos hidrofóbicos que apresentam baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos devido as características simétricas da sua estrutura, fato que dificulta o seu manuseio durante o preparo da formulação, bem como sua administração em tratamentos oncológicos. Para resolver este problema e permitir o uso do fotossensibilizador na PDT, o InPc é encapsulado em nanopartículas do copolímero do ácido lático-co-ácido glicólico ligado a moléculas de polietileno glicol (PLGA-PEG) que é biodegradável, biocompatível e comumente usado no preparo de carreadores de fármacos. As moléculas de PEG ligadas covalentemente ao copolímero de PLGA conferem as nanoesferas de PLGA-PEG circulação sanguínea prolongada. Um recente estudo realizado durante o desenvolvimento da presente invenção revelou que o princípio ativo do composto aqui desenvolvido, ou seja, a In(III)-ftalocianina (InPc) encapsulada em nanopartículas de PLGA-PEG aumentou a eficiência fotodinâmica comparada ao fotossensibilizador não encapsulado (Figura 2).

Um dos principais aspectos que diferem o composto desenvolvido na presente invenção e os compostos conhecidos na técnica é a encapsulação de fotossensibilizadores hidrofóbicos, a qual permite a administração sistêmica dos mesmos, sendo então uma vantagem da presente invenção, que atinge uma condição de tamanho de partículas que permitem às mesmas permanecerem por mais tempo na corrente sanguínea, devido a redução do reconhecimento das mesmas por opsoninas (proteínas que sinalizam a ação dos macrófagos). Além disso, a invenção compreende nanoesferas preparadas a partir do copolímero de PLGA ligado a moléculas de polietileno glicol, fato que permite que a superfície das nanoesferas seja revestida por cadeias hidrofílicas que repelem as proteínas plasmáticas, conferindo uma estabilização estérica que aumenta o tempo de circulação médio das nanoesferas na corrente sanguínea.

As características do composto ora proposto, constituído de fotossensibilizadores hidrofóbicos encapsulados em matrizes sólidas, facilitam a administração destes fotossensibilizadores aos pacientes, sob tudo, em vias parenterais. Além disso, a encapsulação aumenta a eficiência fotodinâmica do fotossensibilizador hidrofóbico, pois favorece a maior internalização do InPc nas células cancerígenas (Figura 3), reduz a formação de agregados (Figura 4), bem como, protege o fotossensibilizador de processos de fotodegradação oriundo da etapa de radiação (Figura 5). A encapsulação permite reduzir a agregação do InPc no interior das nanoesferas, no entanto, não impede que haja microregiões contendo agregados de InPc no interior das partículas (Figura 6). O composto ora proposto (InPc encapsulado em nanoesferas poliméricas) apresenta dois padrões de distribuição do InPc dentro das esferas de PLGA-PEG. Numa delas o InPc apresenta-se mais concentrado na região superficial da partícula e em outra o InPc apresenta uma distribuição mais homogênea dentro da microesfera (Figura 7).

As formulações de nanoesferas poliméricas, com tamanhos médios inferiores a 200 nm (Figura 8), contendo o fotossensibilizador In(III)-ftalocianina (também nomeada como cloreto de ftalocianina de índio (III)) desenvolvidas no presente pedido, são para fins de administração intravenosa. Tal formulação nanoparticulada contendo o InPc encapsulado, preferencialmente em nanoesferas de PLGA-PEG, possibilita a redução da agregação e fotodegradação do InPc e o aumento da internalização do fotossensibilizador nas células cancerígenas, causando um aumento na eficiência fotodinâmica deste fotossensibilizador.

O preparo da formulação nanoparticulada é realizado a partir do método de emulsão-
evaporação usando-se preferencialmente, como sistema carreador, o copolímero do ácido lático-co-ácido glicólico ligado a moléculas de polietileno glicol. Entretanto, nada impede que formulações nanoparticuladas possam ser preparadas usando-se outros polímeros como o, polímero do ácido lático, polímero do ácido glicólico, policaprolactona, polibutilcianoacrilato, phtalato acetato de celulose, acetato de celulose, polihidroxibutirato e polihidroxibutirato-valerato, sendo todos os polímeros ligados a moléculas de PEG.

Tal formulação de nanoesferas do copolímero do ácido lático-co-ácido glicólico ligado a moléculas de polietileno glicol (PLGA-PEG) são preparadas preferencialmente com polímeros de massa molar entre 37.000 a 58.000 Daltons (Da) (unidade de massa atômica). Entretanto, formulações podem também ser preparadas usando-se PLGA-PEG com massas molares entre 24.000 e 34.000 Da, ou 67.000 e 162.000. A mesma

formulação pode ser preparada preferencialmente usando-se o PLGA com proporções 50:50 de ácido lático e ácido glicólico, entretanto, PLGA com outras proporções podem ser utilizados, tais como 85:15 (ácido lático:ácido glicólico), 65:35 (ácido lático:ácido glicólico), 75:25 (ácido lático:ácido glicólico).

5 A referida formulação nanoparticulada é preparada pela dispersão de uma fase orgânica constituída de um solvente orgânico, preferencialmente diclorometano:1-metil-2-pirrolidona na proporção de 7:3, outras proporções de diclorometano:1-metil-2-pirrolidona podem ser utilizadas, tais como 7:1, 7:2, 7:4 e 7:5. Na invenção, o diclorometano foi utilizado para dissolver o copolímero enquanto o 1-metil-2-pirrolidona foi utilizado para dissolver o In(III)-ftalocianina. Outros solventes diferentes do diclorometano podem ser utilizados no preparo das formulações nanoparticuladas para dissolver o polímero, como exemplo o dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, acetona, dimetilformamida e acetato de etila, enquanto que para dissolver a In(III)-ftalocianina pode-se usar piridina ou solução de polietileno glicol. Esta fase orgânica deve ser dispersa sobre uma fase aquosa. Esta dispersão pode ser feita via processo de gotejamento ou vertendo o volume total da fase orgânica sobre a fase aquosa. Esta fase aquosa deve ser constituída por um estabilizador coloidal dissolvido em água, preferencialmente o álcool polivinílico (PVA) na concentração de 1,5% (m:v). No entanto, outras formulações nanoparticuladas podem ser preparadas pela variação da concentração do PVA, entre 0,5% a 3,5% (m:v).

15 Adicionalmente, a referida fase aquosa constituída por um estabilizante coloidal também pode apresentar um solvente que altere a viscosidade desta fase aquosa, preferencialmente o etanol na concentração de 5% (v:v). Entretanto, concentrações de etanol entre 0,01 a 10% (v:v) podem também serem utilizadas, assim como outros solventes capazes de alterarem a viscosidade da fase aquosa. Vale ressaltar que a proporção entre as fases orgânica/aquosa, preferencialmente, foi mantida em 20% (v:v), no entanto, proporções entre 10 a 30% entre as fases podem também ser utilizadas.

25 Alternativamente, a formulação passa por uma etapa posterior de secagem usando métodos conhecidos como liofilização ou secagem por spray dryer, caso deseje-se obter a formulação na fase sólida.

30 Na dispersão da fase orgânica sobre a fase aquosa, a fase aquosa é mantida sob agitação usando preferencialmente um homogeneizador do tipo Turrax[®], mas agitadores mecânicos ou magnéticos podem também ser utilizados.

Na principal concretização para o preparo da composição desenvolvida, de nanoesferas com tamanhos médios inferiores a 200 nm contendo In(III)-ftalocianina, utiliza-se etanol (5% v:v) e um estabilizador coloidal, preferivelmente álcool polivinílico (1,5% m/v), na fase aquosa, bem como um polímero para a construção da matriz sólida da nanoesfera, e InPc na fase orgânica, de forma que a proporção entre as fases orgânica/aquosa fosse mantida em 20% (v:v). Então, a fase orgânica deve ser adicionada rapidamente à fase aquosa usando-se uma seringa de vidro acoplada a uma agulha número 24 G^{3/4} ($\phi = 0,055$ cm e comprimento = 2,0 cm) que deve estar sob a agitação de um homogeneizador, preferencialmente do tipo Turrax, de 24.000 rpm. Posteriormente, a emulsão resultante deve ser mantida sob agitação magnética por 24 horas para evaporação do solvente orgânico.

Nesta invenção o processo de otimização do tamanho das nanoesferas, bem como, a plena compreensão da influência da concentração do agente emulsificante, da proporção entre as fases orgânica aquosa e da porcentagem de ethanol na fase aquosa sobre o tamanhos das nanoesferas, a eficiência de recuperação das nanopartículas, a eficiência de encapsulação do InPc e a porcentagem residual do agente emulsificante foi determinada pelo uso de um planejamento fatorial 2³. Os cálculos do efeitos e influências de cada parâmetro pode ser efetuado manualmente ou através de softwares disponíveis no mercado como Design Expert, Statistica ou MatLab.

Na invenção, o aumento da porcentagem de etanol (de 0 a 10% v:v) na fase aquosa e da concentração de PVA (de 0,5 a 1,5% m:v) diminui o tamanho das partículas, sendo a porcentagem de PVA a responsável pela maior redução (Figura 9). No entanto, o aumento da proporção entre as fases orgânica/aquosa (o/a) (entre 10 a 30% v:v) causa um aumento no tamanho das partículas poliméricas (Figura 9). A invenção apresenta ainda uma interação sinérgica binária entre a proporção das fases orgânica/aquosa e a porcentagem de etanol na fase aquosa que reduz o tamanho da partícula, e de interações ternárias entre os dois parâmetros acima citados somados a concentração de PVA que aumenta o tamanho da partícula (Figura 9). A redução do tamanho da partícula causada pela concentração de PVA se deve ao aumento da viscosidade da fase aquosa, bem como a diminuição da tensão interfacial entre a fase aquosa/orgânica, favorecendo a diminuição do tamanho das nanoesferas de PLGA-PEG. Já o álcool etílico causa um aumento na viscosidade da fase aquosa, dificultando a coalescência das gotículas de fase orgânica obtidas durante a dispersão produzida pelo agitador, evitando a agregação das partículas e o conseqüente aumento do diâmetro das mesmas. O aumento da

proporção entre as fases orgânica/aquosa causa a coalescência das gotículas da fase orgânica somada a queda na eficiência da agitação da emulsão fato que aumenta o tamanho da partícula.

5 O aumento da concentração de PVA (de 0,5 a 1,5% m:v) diminui a porcentagem de recuperação das partículas, enquanto que o aumento da proporção o/a aumenta a recuperação (Figura 10). Interações sinérgicas entre a proporção entre as fases o/a e a porcentagem de etanol na fase aquosa aumenta a recuperação das partículas, enquanto que interações antagônicas entre a proporção o/a e a concentração de PVA reduz a eficiência da recuperação das nanoesferas (Figura 10). A invenção é caracterizada pelo
10 fato de que quanto menor o diâmetro das partículas menor também se torna a porcentagem de recuperação, fato que está associado à rotação (63988 x g) e ao tempo de centrifugação (22 min) usado nas etapas de lavagens. Maior eficiência de recuperação pode ser obtida após etapas de lavagem usando-se rotações maiores que 63998 x g e tempos de centrifugação superiores a 22 min.

15 O aumento da proporção o/a (de 10 a 30% v:v) (Fator A) e da porcentagem de etanol na fase aquosa (de 0 a 10% v:v) (Fator B) diminui a eficiência de encapsulação do InPc enquanto o aumento da concentração de PVA (de 0,5 a 1,5% m:v) (Fator C) aumenta a encapsulação do fotossensibilizador (Figura 11). Todos os efeitos combinatórios dos parâmetros envolvidos no preparo das nanoesferas influenciam a encapsulação do InPc
20 nas nanoesferas de PLGA-PEG sendo o maior efeito sinérgico, entre a proporção o/a e a concentração de PVA, responsável pelo aumento da encapsulação (Figura 11). O etanol favorece a solubilização do InPc em meio aquoso, fato que torna o aumento individual deste fator responsável pela diminuição da porcentagem de encapsulação enquanto que o aumento da proporção o/a reduz a viscosidade da fase orgânica e aumenta o volume
25 de metilpirrolidona favorecendo a difusão do InPc para a fase aquosa durante a evaporação do solvente orgânico, fato que diminui a eficiência de encapsulação do InPc. O aumento da concentração de PVA aumenta a viscosidade da fase aquosa. Tal fato favorece a obtenção de partículas pequenas que apresentam um maior número de moléculas de PVA localizadas na interface entre as fases orgânica e aquosa. Isto
30 dificulta a difusão da droga encapsulada da fase orgânica para a fase aquosa, levando ao aumento da porcentagem de encapsulação.

Apenas o aumento do etanol na fase aquosa (de 0 a 10% v:v) diminui o valor negativo do potencial zeta (Figura 12). O potencial diminui em razão do acúmulo de InPc na superfície das nanoesferas motivado pela difusão do fotossensibilizador para o

meio aquoso devido ao aumento do etanol. O valor negativo do potencial é justificado pela presença dos grupos carboxílicos localizados nas cadeias do PLGA-PEG.

5 A concentração de PVA (de 0,5 a 1,5% m:v) é o único parâmetro que aumenta a porcentagem residual de PVA sobre as nanoesferas de PLGA-PEG enquanto o efeito combinatório entre a proporção o/a (de 10 a 30% v:v) e a concentração de PVA (de 0,5 a 1,5% m:v) diminui o PVA residual. O PVA é o principal parâmetro responsável pela diminuição do tamanho das nanoesferas de PLGA-PEG. Partículas de menor diâmetro tendem a apresentar maior porcentagem de PVA residual, fato que faz o aumento da concentração de PVA aumentar a quantidade residual do álcool polivinílico. O efeito 10 combinatório antagônico (negativo) entre a concentração de PVA e a proporção o/a sobre o PVA residual se deve ao efeito da proporção o/a em aumentar o tamanho da nanoesfera, fato que ocasiona na redução da porcentagem de PVA residual.

15 A invenção aqui descrita não está limitada a essa concretização e, aqueles com habilidade na técnica irão perceber que, qualquer característica particular nela introduzida, deve ser entendida apenas como algo que foi descrito para facilitar a compreensão e não podem ser realizadas sem se afastar do conceito inventivo descrito. As características limitantes do objeto da presente invenção estão relacionadas às reivindicações que fazem parte do presente relatório.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica, CARACTERIZADA pelo fato de que compreende a ftalocianina de índio (InPc) encapsulada em nanoesferas de um polímero de circulação sanguínea prolongada.
2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que o polímero é selecionado dentre o grupo consistindo em: copolímero do ácido lático-glicólico (PLGA), polímero do ácido lático, polímero do ácido glicólico, policaprolactona, polibutileanoacrilato, phtalato acetato de celulose, acetato de celulose, polihidroxibutirato e polihidroxibutirato-valerato, sendo todos os polímeros ligados a moléculas de polietileno glicol.
3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que o polímero é preferencialmente o copolímero do ácido lático-glicólico ligado a moléculas de polietileno glicol (PLGA-PEG).
4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 3, CARACTERIZADA pelo fato de que as nanoesferas do PLGA-PEG apresentam diâmetros médios inferiores a 200 nm.
5. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, CARACTERIZADA pelo fato de que o PLGA-PEG apresenta massas molares dentre as faixas de 24.000 e 34.000 Da, 37.000 e 58.000 Da, ou 67.000 e 162.000 Da.
6. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, CARACTERIZADA pelo fato de que o PLGA apresenta preferencialmente massas molares dentre 37.000 e 58.000 Da.
7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, CARACTERIZADA pelo fato de que o PLGA-PEG apresenta uma proporção selecionada dentre o grupo consistindo em: 85:15, 75:25, 65:35 e 50:50 de ácido lático:ácido glicólico.
8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, CARACTERIZADA pelo fato de que o PLGA-PEG apresenta preferencialmente a proporção de 50:50 de ácido lático:ácido glicólico.
9. Composição farmacêutica, de acordo com as reivindicações de 1 a 8, CARACTERIZADA pelo fato de ser para fins de administração intravenosa em terapia fotodinâmica.

10. Composição farmacêutica, de acordo com as reivindicações de 1 a 9, CARACTERIZADA pelo fato de ser para o tratamento de doenças oncológicas.
11. Composição farmacêutica, de acordo com as reivindicações de 1 a 9, CARACTERIZADA pelo fato de ser para o tratamento de doenças não oncológicas
- 5 causadas por vírus, bactérias ou fungos.
12. Processo para preparo de uma composição compreendendo ftalocianina de índio (III) (InPc) encapsulada, CARACTERIZADO pelo fato de consistir em um método de emulsão-
10 evaporação, compreendendo a dispersão de uma fase orgânica, constituída da mistura de dois solventes orgânicos, um polímero para construção da matriz sólida da nanoesfera e ftalocianina de índio, sobre uma fase aquosa, constituída por um estabilizador coloidal dissolvido em água, sob a agitação de um homogeneizador, sendo a emulsão resultante submetida a agitação magnética para evaporação do solvente orgânico.
13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, CARACTERIZADO pelo fato de que a
15 composição alternativamente é submetida a uma etapa posterior de secagem por spray dryer ou liofilização.
14. Processo, de acordo com a reivindicação 12, CARACTERIZADO pelo fato de que a dispersão da fase orgânica sobre a fase aquosa é feita preferencialmente de forma rápida através de seringa, ou vertendo o volume total da fase orgânica sobre a fase
20 aquosa. Nada impede que a dispersão da fase orgânica sobre a fase aquosa seja efetuada via processo de gotejamento.
15. Processo, de acordo com a reivindicação 12, CARACTERIZADO pelo fato de que durante etapa da dispersão, o homogeneizador utilizado é preferencialmente do tipo Turrax[®], de 24.000 rpm.
- 25 16. Processo, de acordo com a reivindicação 15, CARACTERIZADO pelo fato de que alternativamente são utilizados agitadores mecânicos ou magnéticos.
17. Processo, de acordo com a reivindicação 12, CARACTERIZADO pelo fato de que a emulsão resultante é submetida a agitação magnética, para evaporação do solvente orgânico, preferencialmente por um período de 24 horas. Nada impede que tal
30 evaporação seja acelerada por equipamentos como rotaevaporadores.
18. Processo, de acordo com a reivindicação 12, CARACTERIZADO pelo fato de que dois solventes orgânicos constituem a fase orgânica sendo um dos solventes usado para solubilizar o polímero e o outro solvente para solubilizar o InPc.

19. Processo, de acordo com a reivindicação 18, CARACTERIZADO pelo fato de que o solvente orgânico utilizado para solubilizar o polímero é selecionado dentre o grupo consistindo em: clorofórmio, diclorometano, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, acetona, dimetilformamida e acetato de etila.
- 5 20. Processo, de acordo com a reivindicação 18, CARACTERIZADO pelo fato de o solvente orgânico utilizado para dissolver o InPc é selecionado dentre o grupo consistindo de 1-metil-2-pirrolidona, piridina e solução de polietileno glicol.
21. Processo, de acordo com as reivindicações 19 e 20, CARACTERIZADO pelo fato de que a fase orgânica é preferencialmente constituída de uma mistura diclorometano
10 (usado para solubilizar o polímero) : 1,2 metil-pirrolidona (usado para dissolver o InPc).
22. Processo, de acordo com a reivindicação 21, CARACTERIZADO pelo fato de que a mistura diclorometano:1,2 metil-pirrolidona é utilizada na proporção selecionada dentre o grupo consistindo em: 7:1, 7:2, 7:3, 7:4 e 7:5 (v:v).
23. Processo, de acordo com a reivindicação 22, CARACTERIZADO pelo fato de que é
15 utilizado a mistura dos solventes diclorometano:1-metil-2-pirrolidona na proporção de 7:3.
24. Processo, de acordo com a reivindicação 12, CARACTERIZADO pelo fato de que o polímero para construção da matriz sólida da nanoesfera utilizado na fase orgânica é selecionado dentre o grupo consistindo em: copolímero do ácido láctico-glicólico
20 (PLGA-PEG), polímero do ácido láctico, policaprolactona, polibutílicoacrilato, phtalato acetato de celulose, acetato de celulose, polihidroxibutirato e polihidroxibutirato-valerato, sendo todos ligados a molécula de PEG.
25. Processo, de acordo com a reivindicação 12, CARACTERIZADO pelo fato de que o polímero para construção da matriz sólida da nanoesfera utilizado na fase orgânica é preferencialmente o copolímero do ácido láctico-glicólico ligado a moléculas de polietileno glicol (PLGA-PEG).
26. Processo, de acordo com a reivindicação 12, CARACTERIZADO pelo fato de que a fase aquosa apresenta adicionalmente um solvente para alterar a viscosidade.
27. Processo, de acordo com a reivindicação 26, CARACTERIZADO pelo fato de que o
30 referido solvente é preferivelmente etanol.
28. Processo, de acordo com a reivindicação 27, CARACTERIZADO pelo fato de que o etanol é utilizado na concentração de 0,01% a 10% (v:v).
29. Processo, de acordo com a reivindicação 28, CARACTERIZADO pelo fato de que o etanol é utilizado preferencialmente na concentração de 5% (v:v).

30. Processo, de acordo com a reivindicação 12, CARACTERIZADO pelo fato de que o estabilizador coloidal utilizado na fase aquosa é preferencialmente álcool polivinílico (PVA).
- 5 31. Processo, de acordo com a reivindicação 30, CARACTERIZADO pelo fato de que o álcool polivinílico (PVA) é utilizado em concentrações dentre 0,5% e 3,5% (m:v).
32. Processo, de acordo com a reivindicação 31, CARACTERIZADO pelo fato de que o álcool polivinílico (PVA) é utilizado preferencialmente em uma concentração de 1,5% (m:v).
- 10 33. Processo, de acordo com as reivindicações 1 e 12, CARACTERIZADO pelo fato das propriedades nanoparticuladas como tamanho, eficiência de encapsulação, potencial zeta, eficiência de recuperação e porcentagem residual de PVA serem controladas a partir da determinação das influências da concentração do PVA, da proporção entre as fases orgânica/aquosa (o/a), e a porcentagem de etanol na fase aquosa sobre estas propriedades.
- 15 34. Processo, de acordo com a reivindicação 33, CARACTERIZADO pelo fato de que o aumento da porcentagem de etanol (de 0 a 10% v:v) na fase aquosa e da concentração de PVA (de 0,5 a 1,5% m:v) diminui o tamanho das partículas, sendo a porcentagem de PVA a responsável pela maior redução. No entanto, o aumento da proporção entre as fases orgânica/aquosa (o/a) (entre 10 a 30% v:v) causa um aumento no tamanho das
- 20 partículas poliméricas.
35. Processo, de acordo com a reivindicação 33, CARACTERIZADO pelo fato de que o aumento da concentração de PVA (de 0,5 a 1,5% m:v) diminui a porcentagem de recuperação das partículas, enquanto que o aumento da proporção o/a aumenta a recuperação. As interações sinérgicas entre a proporção o/a e a porcentagem de etanol
- 25 na fase aquosa aumenta a recuperação das partículas, enquanto que interações antagônicas entre a proporção o/a e a concentração de PVA reduz a eficiência da recuperação das nanoesferas.
36. O processo, de acordo com a reivindicação 33, CARACTERIZADO pelo fato de que o aumento da proporção o/a (de 10 a 30% v:v) e da porcentagem de etanol na fase
- 30 aquosa (de 0 a 10% v:v) diminui a eficiência de encapsulação do InPc enquanto o aumento da concentração de PVA (de 0,5 a 1,5% m:v) aumenta a encapsulação do fotossensibilizador. O efeito sinérgico entre a proporção o/a e a concentração de PVA aumenta a encapsulação do InPc.

37. Processo, de acordo com a reivindicação 33, CARACTERIZADO pelo fato de que apenas o aumento da concentração do etanol na fase aquosa (de 0 a 10% v:v) diminui o valor negativo do potencial zeta.
- 5 38. Processo, de acordo com a reivindicação 33, CARACTERIZADO pelo fato de que apenas a concentração de PVA (de 0,5 a 1,5% m:v) aumenta a porcentagem residual de PVA sobre as nanoesferas de PLGA-PEG enquanto o efeito combinatório sinérgico entre a proporção o/a (de 10 a 30% v:v) e a concentração de PVA (de 0,5 a 1,5% m:v) diminui o PVA residual.
- 10 39. Processo, de acordo com as reivindicações de 33 a 38, CARACTERIZADO pelo fato de que a composição otimizada apresenta nanoesferas de PLGA-PEG contendo InPc com diâmetro médio de 127 ± 8 nm, porcentagem média de encapsulação de $72 \pm 6\%$, uma eficiência de recuperação das nanoesferas de $46 \pm 4\%$, potencial zeta de $-33,9 \pm 3$ mV e uma porcentagem de PVA residual de $18 \pm 4\%$.
- 15 40. Processo, de acordo com as reivindicações de 12 a 39, CARACTERIZADO pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica conforme definida nas reivindicações 1 a 11.

DESENHOS

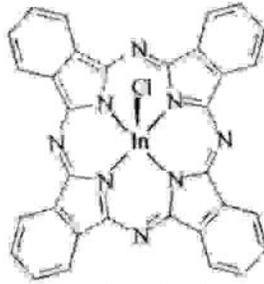


FIG. 1

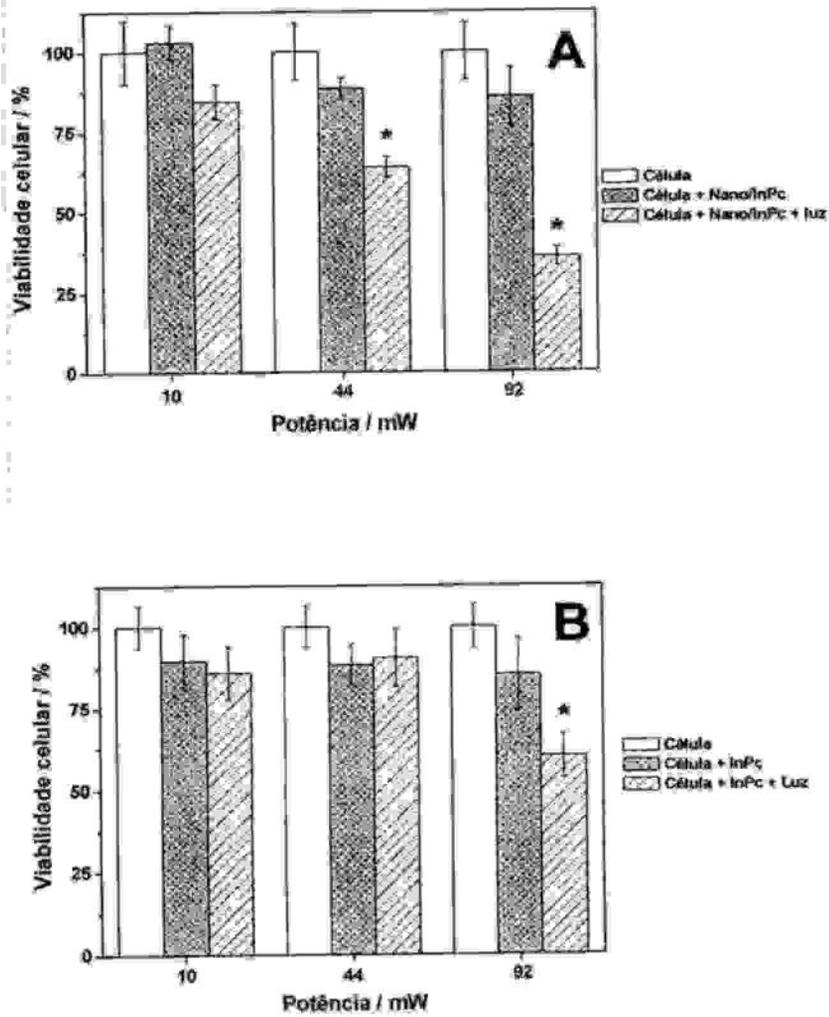


FIG. 2

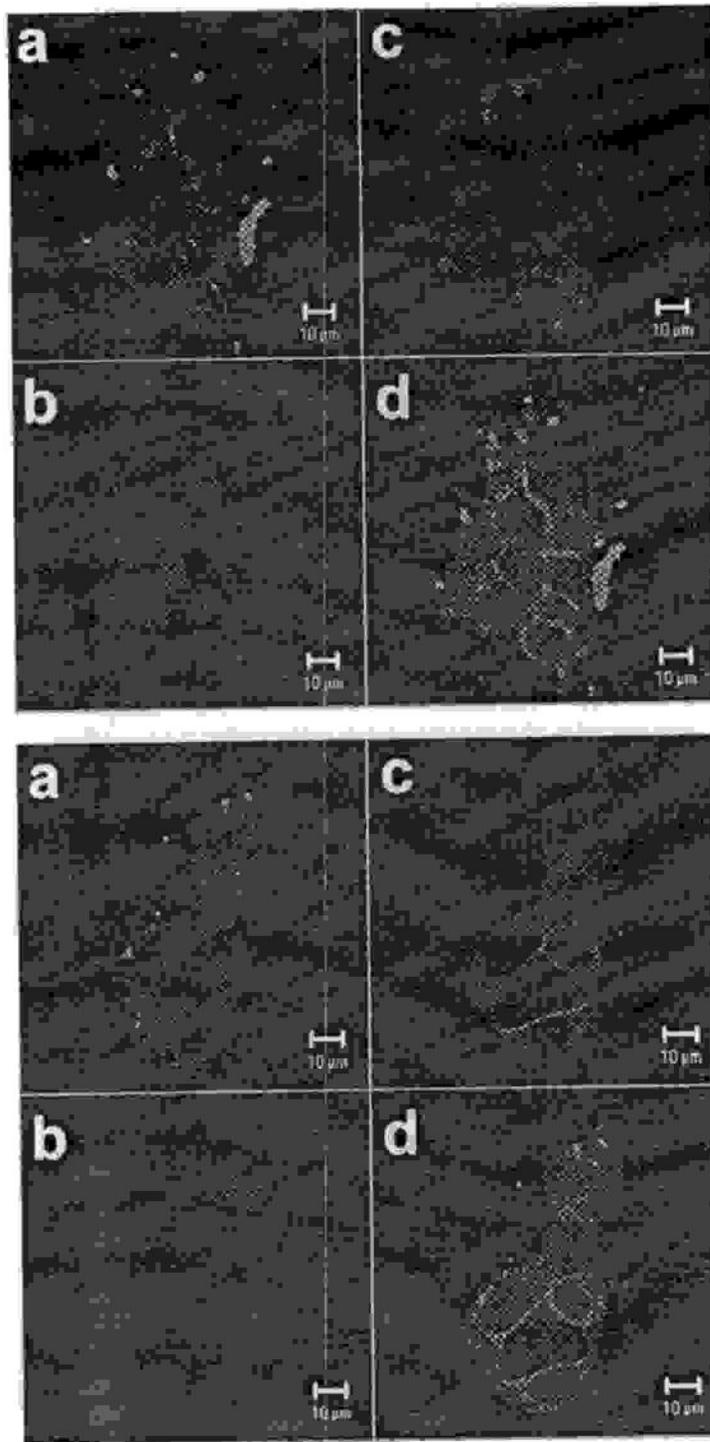


FIG. 3

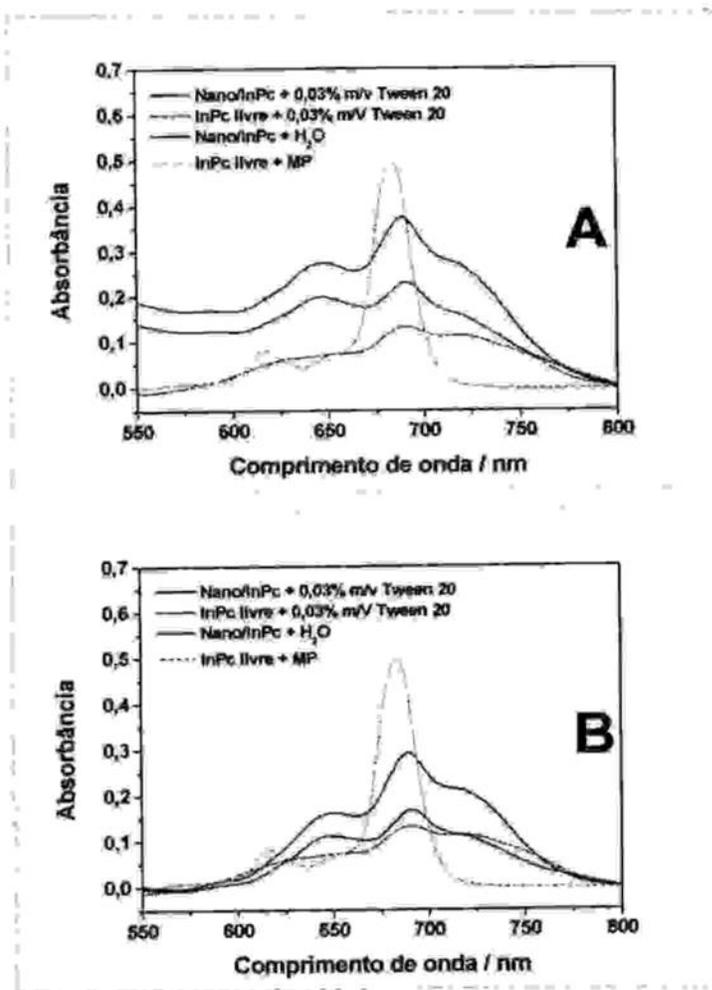


FIG. 4

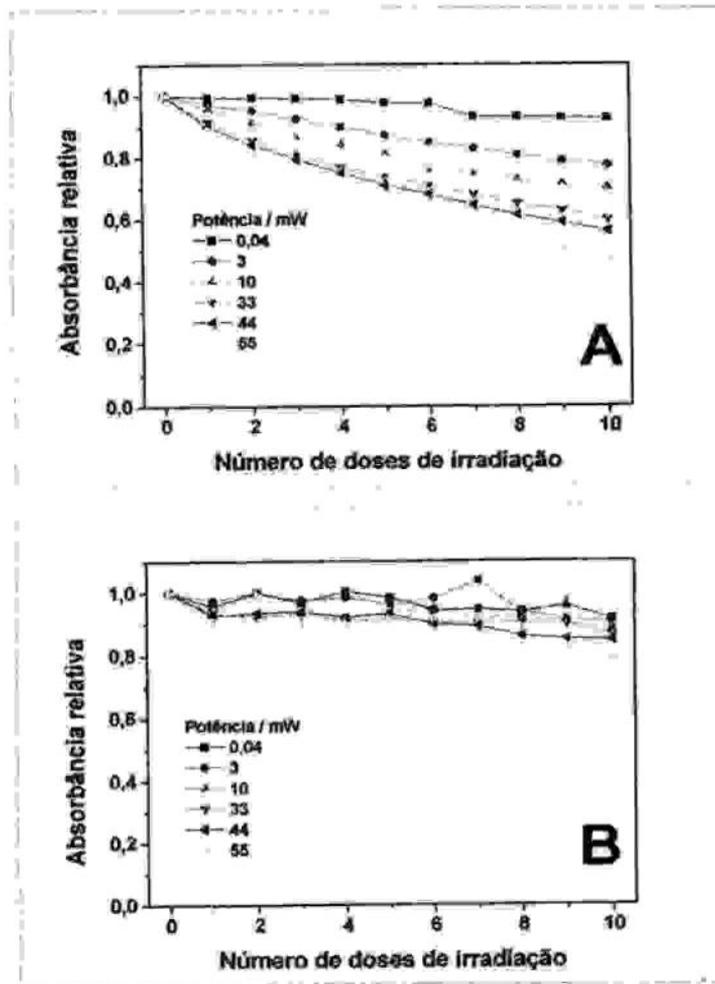


FIG. 5

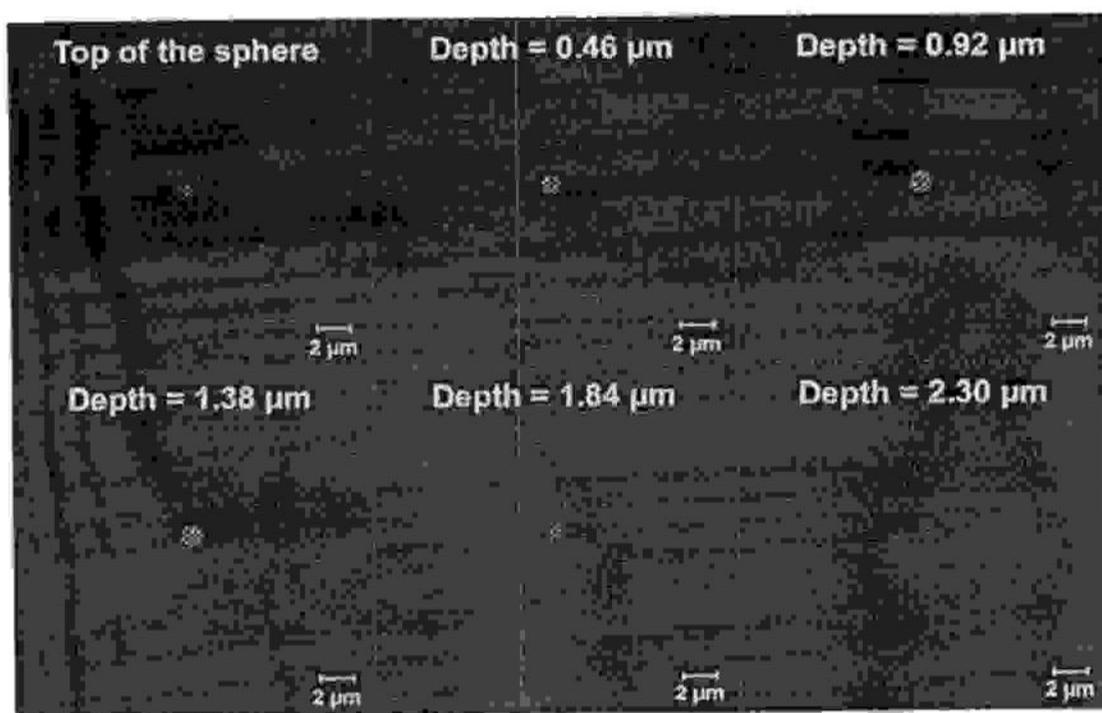


FIG. 6

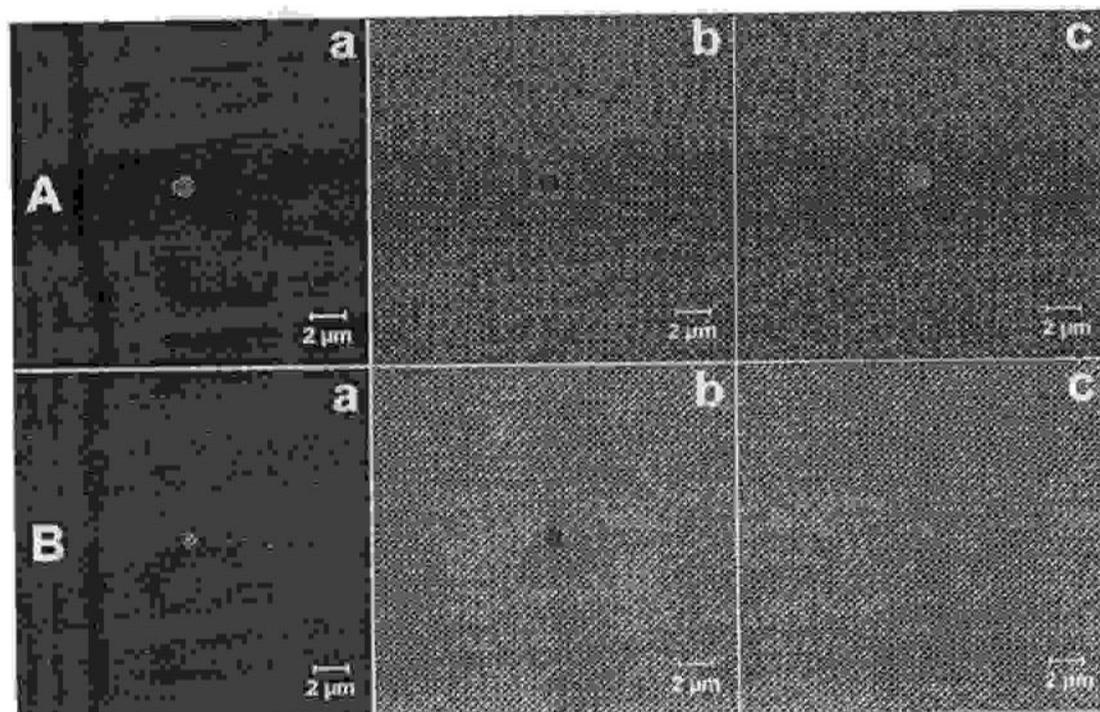


FIG. 7

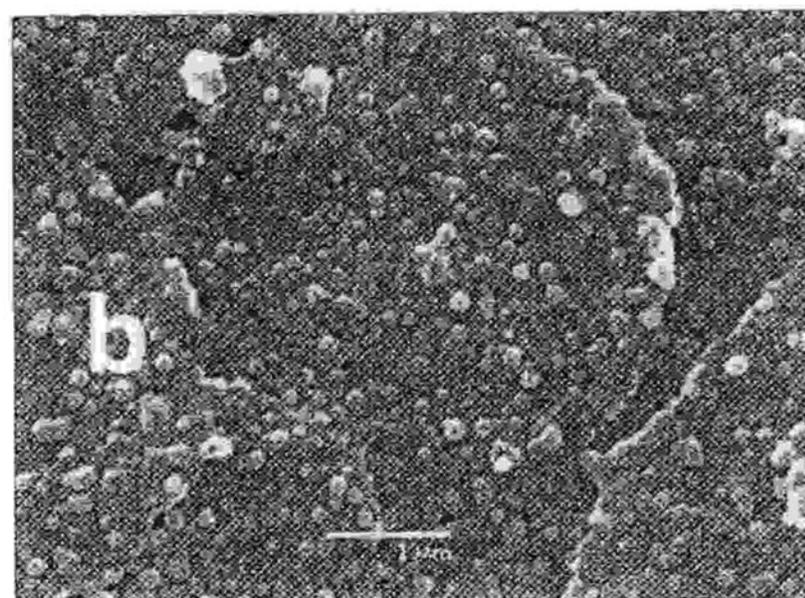
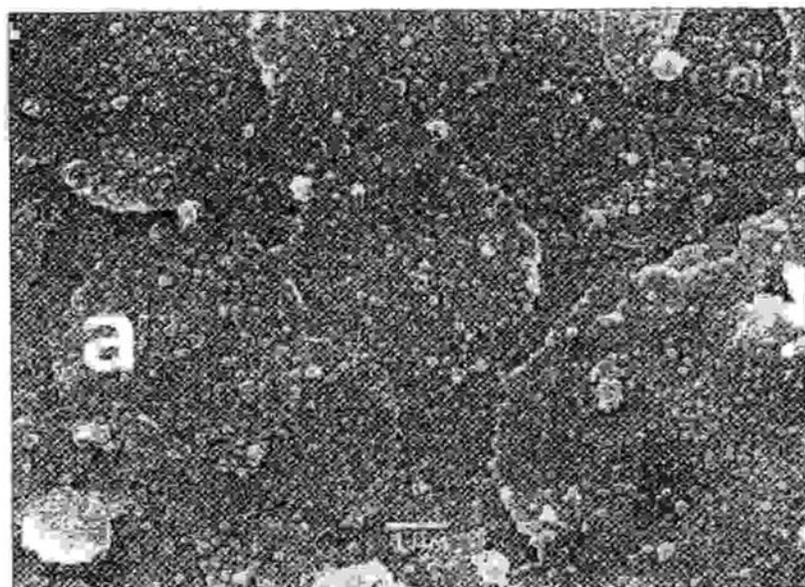


FIG. 8

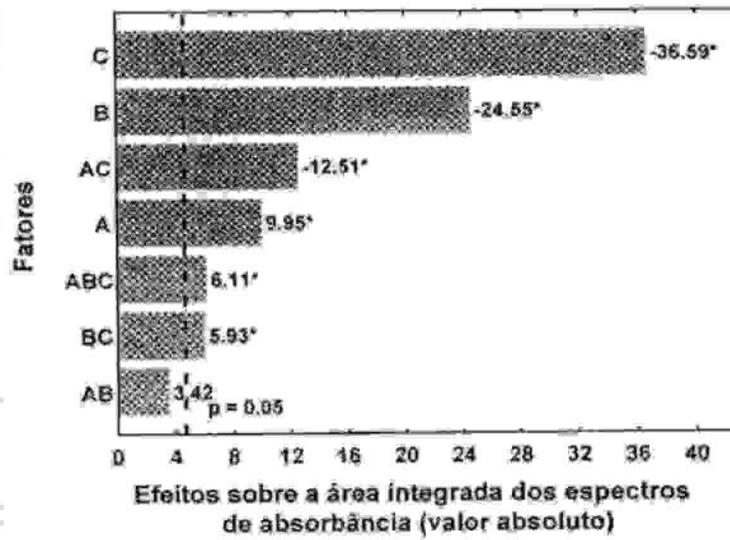


FIG. 9

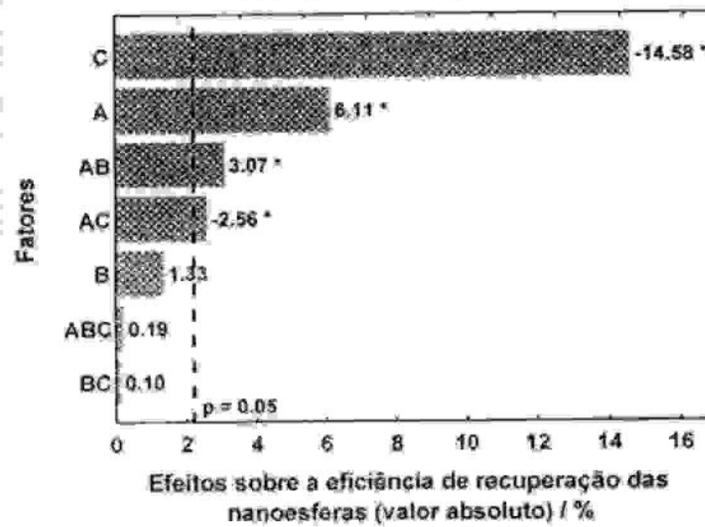


FIG. 10

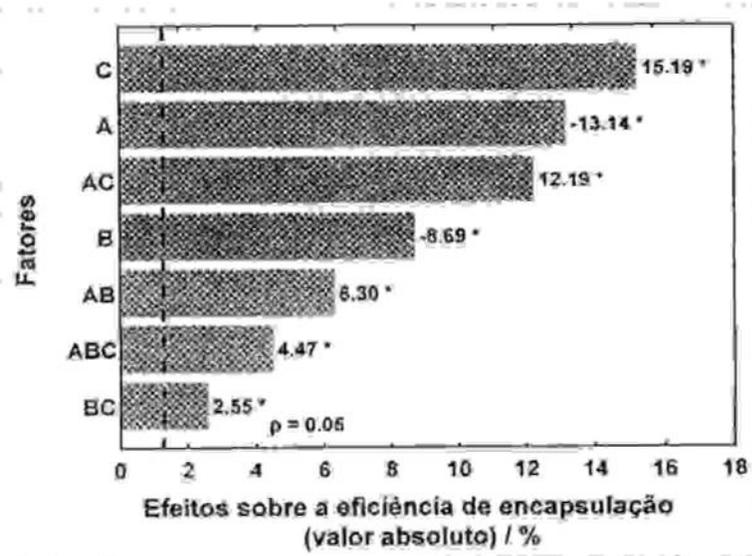


FIG. 11

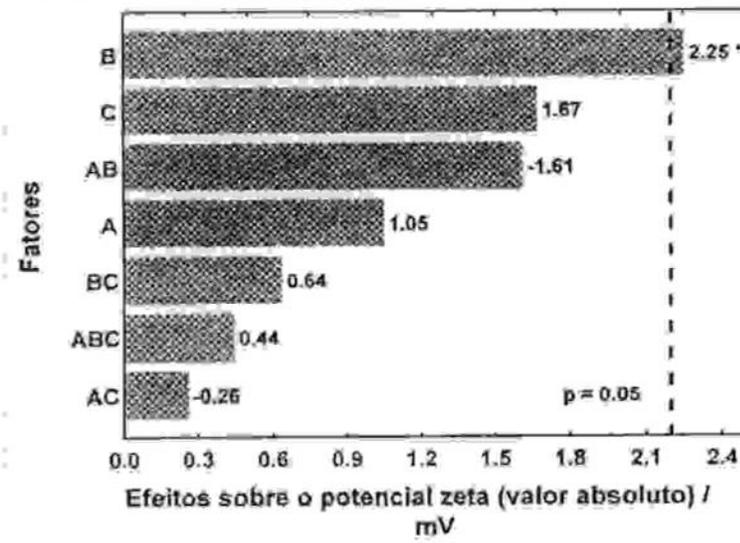


FIG. 12

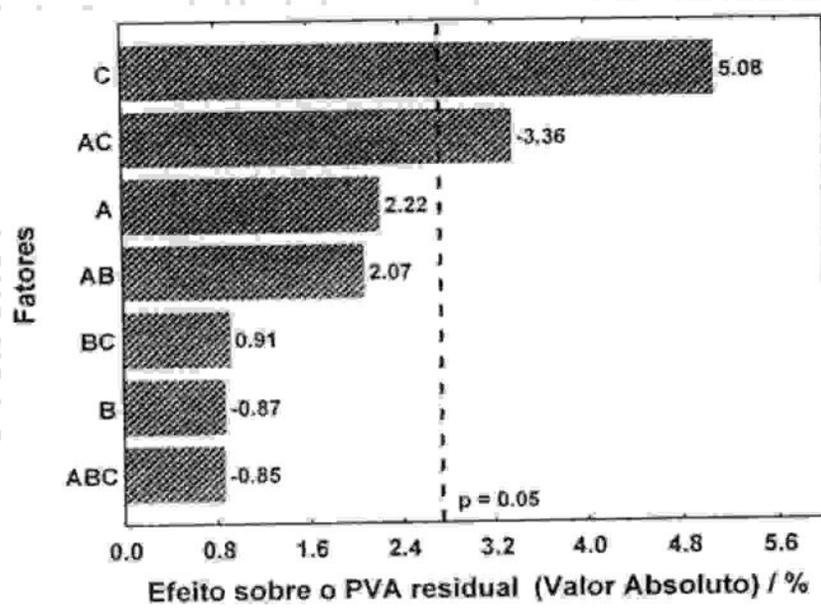


FIG. 13