



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

(11) PI 0306774-2 B1

(22) Data do Depósito: 03/12/2003

(45) Data de Concessão: 05/06/2018



* B R P I 0 3 0 6 7 7 4 B 1 *

(54) Título: LIPOSSOMAS PH-SENSÍVEIS DE CISPLATINA E OUTROS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS E SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO

(51) Int.Cl.: A61K 9/127; A61P 35/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

(72) Inventor(es): MÔNICA CRISTINA DE OLIVEIRA; GILSON ANDRADE RAMALDES; MÍRIAM TERESA PAZ LOPES; FERNANDA PIRES VIEIRA; THÉA LUCIANA MESQUITA; VANESSA JÓIA DE MELLO

“LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CISPLATINA E OUTROS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS E SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO ”

14

- A presente invenção apresenta novas formulações de lipossomas de cisplatina e outros agentes antineoplásicos assim como os métodos de seu
- 5 preparo. Essas formulações de lipossomas são capazes de proporcionar a eliminação ou redução dos efeitos adversos produzidos por esses fármacos, levar à uma maior seletividade farmacológica, eliminar o aparecimento de resistência ao tratamento e permitir a adoção de regimes de poliquimioterapia com o uso de associação de fármacos que são incompatíveis sob a forma livre.
- 10 Atualmente, a cisplatina é um dos fármacos mais amplamente utilizados na quimioterapia do câncer, apresentando espectro de ação contra vários tumores sólidos, incluindo câncer testicular, carcinoma de ovário, cabeça, pescoço e câncer de pulmão (WILLIAMS, S.D., EINHORN, L.H. Neoplasms of the testis. In: CALABRESI, P., SCHEIN, P.S., ROSEMBERG,
- 15 S.A. Medical Oncology. New York, 1985, p. 1077-1088; SHIRAZI *et al.*, Cytotoxicity, accumulation, and efflux of cisplatin and its metabolites in human ovarian carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 140, p. 211-218, 1996; GUILOT *et al.*, Neoadjuvant chemotherapy in multiple synchronous head and neck and esophagus squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*, v.
- 20 102, n. 3, p. 311-319, 1992; LE CHEVALIER *et al.*, Randomized trial of vinorelbine and cisplatin versus vindesine and cisplatin versus vinorelbine alone in advanced non-small-cell lung cancer: Results of a European multicenter trial including 612 patients. *Journal of Clinical Oncology*, v. 12, p. 360-367, 1994).
- 25 No entanto, o uso da cisplatina na sua forma livre apresenta alguns inconvenientes, tais como: o aparecimento de resistência clínica; surgimento de efeitos adversos graves, sobretudo nefrotoxicidade severa, mielosupressão,

15

- ototoxicidade e neurotoxicidade, como também a existência de incompatibilidades farmacotécnicas durante a administração da cisplatina juntamente com outros fármacos, dificultando a utilização de poliquimioterapia. Alguns dos problemas relatados são: (i) precipitação em presença de
- 5 etoposídeo dissolvido em solução de cloreto de sódio (STEWART & HAMTON, *A. J. Hosp. Pharm.*, v. 46, p. 1400-1404, 1989); (ii) precipitação em presença de tiotepa dissolvida em glicose a 5 % (TRISEEL & MARTINEZ, Compatibility of thiotepa (lyophilized) with selected drugs during simulated y-site administration. *Am. J. Health-Syst Pharm.*, v. 53, p. 1041-1051, 1996); (iii)
- 10 degradação da cisplatina decorrente de sua interação com trometamol, um excipiente utilizado na formulação do 5-fluoracila (FOURNIER *et al.*, Modification of the physicochemical and pharmacological properties of anticancer platinum compounds by commercial 5-fluoracil formulations: a comparative study using cisplatin and carboplatin. *Cancer Chemotherapy and*
- 15 *Pharmacology*, v. 29, n. 6, p. 461-466, 1992). Inúmeras pesquisas científicas têm buscado alternativas para melhorar a seletividade dos compostos de platina com atividade antitumoral, visando a redução dos efeitos colaterais graves, sobretudo a nefrotoxicidade. O encapsulamento da cisplatina em lipossomas constitui uma proposta promissora para o aprimoramento da terapia
- 20 antitumoral. Lipossomas constituídos de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, diestearoilfosfatidiletanolamina associada a moléculas de metoxipolietilenoglicol de peso molecular 2000 (2000MPEG-DSPE) e colesterol, na razão molar de 51:5:44, apresentando um diâmetro igual a 100 nm, têm sido preparados para carrear moléculas de cisplatina (PELEG-
- 25 SHULMAN *et al.*, Characterization of serically stabilized cisplatin liposomes by nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1510, p. 278-

16

291, 2001; Sequus Pharmaceuticals, Inc., R. M. Abra, K. Reis, Liposomes containing a cisplatin compound. Int. A61K 009/127. U.S. n. 5,945,122. 22 August 1997, 31 August 1999). Devido ao seu pequeno tamanho, longo tempo de circulação sanguínea e interação reduzida com os constituintes do sangue, as formulações desses lipossomas furtivos apresentam distribuição tecidual característica dos lipossomas e não do fármaco internalizado (NEWMAN *et al.*, Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 43, p. 1-7, 1999). Newman e colaboradores investigaram o comportamento farmacocinético, a biodistribuição e a eficácia terapêutica desses lipossomas comparativamente à cisplatina na forma não encapsulada, utilizando modelos tumorais de carcinoma de cólon e pulmão. Os resultados deste estudo demonstraram haver um aumento da concentração da cisplatina na região tumoral, a partir da formulação encapsulada, com melhora da eficácia terapêutica. Além disso, foi detectado uma quantidade de platina nos rins quatro vezes menor do que nos animais tratados com a cisplatina livre. Harrington e colaboradores (HARRINGTON *et al.*, Pegylated liposome-encapsulated doxorubicin and cisplatin enhance the effect of radiotherapy in a tumor xenograft model. *Clinical Cancer Research*, v. 6, p. 4939-4949, 2000) avaliaram a utilização desses lipossomas na quimioterapia associada com a radioterapia, utilizando modelos de animais implantados com tumores de cabeça e pescoço. Os resultados deste estudo demonstraram que esses lipossomas aumentam o efeito da radioterapia, sem a ocorrência de toxicidade cutânea ou sistêmica. Com base nestes resultados, estudos clínicos de fase I e II foram realizados administrando-se esses lipossomas de cisplatina em

17

pacientes com câncer escamoso de cabeça e de pescoço localizado avançado. Porém, neste estudo os lipossomas de cisplatina mostraram-se inativos. A causa possível para a ineficácia desse tratamento foi a reduzida biodisponibilidade desta formulação, exigindo novos estudos relativos à

5 composição fosfolípídica de forma a aumentar a razão fármaco/lípide e a sua biodisponibilidade.

Portanto, visando melhorar a biodisponibilidade dos lipossomas contendo agentes antineoplásicos, a presente invenção refere-se ao desenvolvimento de formulações de lipossomas pH-sensíveis convencionais e

10 furtivos de cisplatina e outros agentes antineoplásicos, os quais apresentam o potencial de liberarem o fármaco, preferencialmente, na região tumoral, aumentando assim a sua biodisponibilidade no sítio de ação.

Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a

15 dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). Estes derivados organizam-se em meio aquoso, à temperatura ambiente, sob a forma hexagonal, não sendo capazes de se apresentarem na forma de vesículas (SIEGEL, D.P. Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal lipid phases-II. Implications for membrane-membrane interactions

20 and membrane fusion. *Biophysical Journal*, v. 49, p. 1171-1183, 1986). A formação de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de coleslerila (CHEMS), que em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada. Estes estabilizantes são capazes de se inserirem entre as moléculas de

25 fosfolípides, sendo que o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no estabilizante, e os grupos fosfato dos

- fosfolípidos favorecem a organização lamelar, possibilitando a formação dos lipossomas. Os lipossomas pH-sensíveis podem ser do tipo convencional ou furtivo. Os lipossomas pH-sensíveis convencionais são constituídos por fosfolípidos e substâncias modificadoras de propriedades da membrana, como
- 5 por exemplo, o colesterol. Esses lipossomas quando administrados por via endovenosa sofrem adsorção de proteínas séricas (opsoninas), ocasionando sua captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), sobretudo as células de Kupffer, presentes no fígado, e os macrófagos esplênicos (DELATTRE, J., COUVREUR, P., PUISIEUX, F., PHILIPOT, J. R., SCHUBER,
- 10 F. Pharmacocinétique et potentialités thérapeutiques des liposomes. In: DELATTRE, J., COUVREUR, P., PUISIEUX, F., PHILIPOT, J. R., SCHUBER, F. (Ed.) Les Liposomes Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques. Paris: Les éditions INSERM & Editions Médicales Internationales, 1993, p. 179-213). Os lipossomas pH-sensíveis furtivos
- 15 também contêm fosfolípidos, como constituinte principal, mas apresentam na bicamada outro composto que torna a superfície das vesículas mais hidrofílica, como por exemplo, os fosfolípidos acoplados à cadeia de polietilenoglicol (PEG). Esses derivados hidrofílicos evitam a adsorção de proteínas séricas na superfície dos lipossomas, reduzindo a sua captação pelo SFM e,
- 20 conseqüentemente, prolongando seu tempo de circulação na corrente sanguínea e permitindo uma maior distribuição do fármaco encapsulado (DU *et al.*, Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1326, n. 2 p. 239-248, 1997). A exposição dos lipossomas pH-sensíveis convencionais ou furtivos a
- 25 um pH ácido resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com conseqüente, desestabilização das vesículas e a liberação do material

encapsulado (OLIVEIRA *et al.*, pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in quasi-anhydrous samples. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1372, n. 2, p. 301-310, 1998; OLIVEIRA *et al.*, Improvement of *in vivo* stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. *Life Sciences*, v. 67, p. 1625-1637, 2000). Uma característica marcante dos tecidos tumorais é o fato do pH extracelular ser mais ácido que dos tecidos normais. O pH intracelular de ambos tecidos são relativamente similares, devido a necessidade de se manter um ambiente favorável para as várias atividades citoplasmáticas. Portanto, o carregamento de agentes antineoplásicos em lipossomas pH-sensíveis convencionais ou furtivos pode permitir a liberação específica do fármaco na região tumoral, refletindo na sua maior biodisponibilidade nesse local.

Ainda para aumentar a eficiência de encapsulação da cisplatina e outros agentes antineoplásicos nos lipossomas, levando a uma maior razão de fármaco/lípide, na presente invenção foi realizada a complexação da cisplatina com ciclodextrina, seguido da encapsulação do complexo obtido em lipossomas pH-sensíveis. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos podendo apresentar seis, sete ou oito unidades de glicose, sendo denominadas como α , β e γ ciclodextrina, respectivamente. A face externa das ciclodextrinas é constituída pelas hidroxilas ligadas ao C-2, C-3 e C-6, o que permite a solvatação pelas moléculas de água assim como a introdução de substituintes sem alterar a cavidade interna (FROMMING, K.L. & SZETLI, J. *Ciclodextrins in Pharmacy*. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, 1993. 225 p). Esses oligossacarídeos possuem um formato do tipo tronco, cuja parte interna apresenta caráter hidrofóbico, responsável pela inclusão de moléculas

hidrofóbicas, promovendo conseqüentemente aumento da solubilidade de moléculas pouco solúveis em água, como é o caso da cisplatina.

A presente invenção aqui descrita refere-se ao desenvolvimento de formulações de liberação controlada de agentes antineoplásicos, para uso em medicina humana e veterinária. As formulações inventivas compreendem lipossomas pH-sensíveis formados por:

- a- um agente terapêutico antineoplásico sob sua forma livre ou complexada com derivados de ciclodextrina;
- b- fosfolípides formadores de fases não lamelares, como por exemplo, derivados da fosfatidiletanolamina;
- c- agentes estabilizantes da bicamada lipídica contendo grupos carboxilados;
- d- agentes hidrofílicos modificadores da superfície da bicamada lipídica;

A formulação de lipossomas pH-sensíveis convencionais, sem restringir, compreende por exemplo:

- a- um agente antineoplásico, como a cisplatina livre ou complexada com um derivado da ciclodextrina, como a hidropropil- β -ciclodextrina;
- b- um fosfolípide formador de fase não lamelar, como a dioleoilfosfatidiletanolamina;
- c- um agente estabilizante da bicamada lipídica, como o hemisuccinato de colessterila.

A formulação de lipossomas pH-sensíveis furtivos, sem restringir, compreende, por exemplo:

- a- um agente antineoplásico, como a cisplatina livre ou complexada com um derivado da ciclodextrina, como a hidropropil- β -ciclodextrina;
- b- um fosfolípide formador de fase não lamelar, como a dioleoilfosfatidiletanolamina;

c- um agente estabilizante da bicamada lipídica, como o hemisuccinato de colessterila.

d- agentes hidrofílicos modificadores da superfície da bicamada lipídica, como por exemplo, a diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol.

5 A presente invenção inova ao apresentar lipossomas pH-sensíveis convencionais e furtivos com um tamanho de partícula igual ou inferior a 1000 nm, preferencialmente com tamanho compreendido entre 80 a 500 nm. A composição dos lipossomas pH-sensíveis convencionais e furtivos apresentam a dioleoilfosfatidiletanolamina em quantidade correspondente a 60 a 75% da concentração lipídica total, mais preferencialmente 60 %; 25 a 40% de hemisuccinato de colessterila, mais preferencialmente 40%. Os lipossomas pH-sensíveis furtivos contêm ainda de 5 a 15 % da concentração lipídica total correspondente a diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol, mais preferencialmente 5 %. A cisplatina é encapsulada nos lipossomas pH-sensíveis convencionais ou furtivos após sua solubilização na forma livre em solução de NaCl 0,9 % (p/v) ou após sua complexação com a hidroxipropil-β-ciclodextrina em solução de NaCl 0,9 % (p/v). O complexo cisplatina/hidroxipropil-β-ciclodextrina foi preparado nas razões molares de cisplatina/hidroxipropil-β-ciclodextrina iguais a 1,0:2,0 a 1,0: 20,0, 15 preferencialmente 1,0:4,0 a 1:18,0, ainda mais especificamente 1:11,0.

20

A invenção aqui descrita apresenta ainda o processo de obtenção das formulações de lipossomas pH-sensíveis convencionais e furtivos contendo o agente antineoplásico. Os métodos usuais de preparo de lipossomas baseiam-se na dissolução dos componentes lipídicos em solventes orgânicos com posterior eliminação desses solventes e hidratação do filme lipídico formado, 25 ou ainda, na injeção da solução orgânica em meio aquoso, seguida da

remoção do solvente orgânico (New, R. R. C. Preparation of liposomes. In: NEW, R. R. C. (Ed.) Liposomes a practical approach. Reino Unido: IRL Press, 1990. p. 33-104). No caso da encapsulação da cisplatina e outros agentes antineoplásicos em lipossomas pH-sensíveis convencionais e furtivos, empregou-se o método de evaporação em fase reversa e na encapsulação do complexo cisplatina/hidroxipropil- β -ciclodextrina utilizou-se o método de congelamento-descongelamento. No preparo dos lipossomas pH-sensíveis de cisplatina, do complexo cisplatina/hidroxipropil- β -ciclodextrina e de outros agentes antineoplásicos instáveis em pH alcalino, sem restringir, fez-se necessário a criação de um processo próprio que permita a obtenção dos lipossomas pH-sensíveis e ao mesmo tempo preserve a estabilidade do agente antineoplásico e garanta uma encapsulação eficaz. É importante mencionar que outros métodos de conhecimento daqueles versados na matéria podem ser empregados para a obtenção dos lipossomas pH-sensíveis convencionais e furtivos contendo os agentes antineoplásicos.

A presente invenção referente aos lipossomas pH-sensíveis de cisplatina e outros agentes antineoplásicos e o seu respectivo processo de obtenção é detalhadamente ilustrada através dos exemplos apresentados abaixo. É necessário frisar que a invenção não está limitada a esses exemplos, mas que também inclui variações e modificações dentro dos objetivos nos quais ela funciona.

Exemplo 1 – Encapsulação da cisplatina em lipossomas pH-sensíveis convencionais e furtivos pelo método de evaporação em fase reversa

Um filme lipídico foi preparado a partir de alíquotas clorofórmicas de dioleoilfosfatidiletanolamina (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemanha) e de hemisuccinato de colestera (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA)

(concentração lipídica compreendida entre 20 a 40 mM, razão molar 6:4). Em seguida, esse filme lipídico foi dissolvido em éter etílico alcalinizado com NaOH. Posteriormente, adicionou-se a solução de cisplatina 2 mg/mL (Quiral Química do Brasil S.A., Juiz de Fora, MG, Brasil) em solução de NaCl 0,9 g% (p/v), na proporção de 1:3 de fase aquosa e etérea, respectivamente. A mistura obtida foi submetida à rápida agitação em vórtex, produzindo uma emulsão do tipo A/O. No caso dos lipossomas pH-sensíveis furtivos foi acrescida à composição lipídica 5 mol% de diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG) (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemanha), mantendo-se entretanto, a mesma concentração lipídica final.

A emulsão A/O foi submetida à evaporação sob vácuo para a eliminação do éter, permitindo a formação das vesículas lipídicas. A cisplatina não encapsulada foi separada dos lipossomas mediante ultracentrifugação a 150000 g, à 10°C, durante 60 minutos para a obtenção dos lipossomas purificados. A taxa de encapsulação da cisplatina foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência após a abertura dos lipossomas purificados com Triton X-100 5,0% (v/v). O diâmetro dos lipossomas foi medido utilizando-se o nanosizer N4 (Coultronics, Margency, França). A taxa de encapsulação da cisplatina nos lipossomas está representada na Tabela 1.

Na Tabela 1 são apresentadas a composição lipídica e a respectiva taxa de encapsulação da cisplatina nessas composições.

Exemplo 2 – Determinação da solubilidade aparente da cisplatina no complexo de associação cisplatina/hidroxipropil-β-ciclodextrina

A determinação da solubilidade da cisplatina complexada com hidroxipropil-β-ciclodextrina foi realizada mediante a adição de quantidades crescentes de hidroxipropil-β-ciclodextrina (Cerestar USA Inc., Indiana, EUA) a uma solução de cisplatina 27 mM em solução de NaCl 0,9 g% (p/v). As

concentrações de hidroxipropil- β -ciclodextrina empregadas estão discriminadas na Tabela 2.

24

Tabela 1 – Avaliação da taxa de encapsulação da cisplatina em lipossomas pH-sensíveis

COMPOSIÇÃO LIPÍDICA	% DE ENCAPSULAÇÃO DA CISPLATINA
	Método Evaporação em Fase Reversa*
DOPE:CHEMS 6:4 (20 mM)	$4,0 \pm 0,3$
DOPE:CHEMS:DSPE-PEG 5,7:3,8:0,5 (20 mM)	$7,0 \pm 0,3$
DOPE:CHEMS:DSPE-PEG 5,7:3,8:0,5 (30 mM)	$8,8 \pm 0,3$
DOPE:CHEMS:DSPE-PEG 5,7:3,8:0,5 (40 mM)	$18,6 \pm 1,3$

5 * O número de amostras foi igual a 3.

Tabela 2 - Razões molares e concentrações de cisplatina e hidroxipropil- β -ciclodextrina utilizadas no preparo de complexos de associação.

Razões Molares CISP/HBPCD	[CISP] (mM)	[HPBCD] (mM)
1: 2,0	27	54,0
1: 4,0	27	108,0
1: 6,0	27	162,0

1: 8,0	27	216,0
1:14,0	27	375,0
1:16,0	27	428,6
1:18,0	27	482,1
1:20,0	27	535,7

5 As dispersões obtidas foram mantidas sob agitação, por aproximadamente cinco dias, à temperatura ambiente. Em seguida, efetuou-se a separação da fase de cisplatina solubilizada da fase insolúvel mediante centrifugação a 14000 rpm, por 10 minutos. A quantificação da concentração de cisplatina solúvel foi realizada empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência. Na Tabela 3 está representada a solubilidade da cisplatina (CISP) na presença de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD).

10 **Tabela 3 - Solubilidade da cisplatina complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina**

Razões Molares CISP/HPBCD	[CISP] Solubilizada (mM)
—	5,8 (So)**
1: 2,0	7,1 \pm 0,7
1: 4,0	7,8 \pm 1,2
1: 6,0	8,5 \pm 0,2
1: 8,0	9,1 \pm 0,5
1: 14,0	9,9 \pm 0,9
1: 16,0	10,4 \pm 0,0
1: 18,0	11,0 \pm 0,1
1: 20,0	11,0 \pm 0,1

* O nº de amostras foi igual a 3.

**So é a solubilidade da CISP na ausência de HPBCD.

Exemplo 3 – Caracterização do complexo de associação cisplatina/hidroxipropil- β -ciclodextrina

O complexo de associação cisplatina/hidroxipropil- β -ciclodextrina foi caracterizado através do uso de calorimetria diferencial de varredura. Os termogramas de diferentes amostras foram obtidos no calorímetro DSC 2910 (TA instruments Lukens Drive, New Castle, EUA), o qual foi calibrado com índio a uma velocidade de aquecimento de 10°C/min.. Amostras de cisplatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, mistura física de hidroxipropil- β -ciclodextrina e cisplatina e o complexo de associação cisplatina/hidroxipropil- β -ciclodextrina liofilizado foram precisamente pesados (4-6 mg) em cadinhos de alumínio semi-herméticos e aquecidas sob fluxo de nitrogênio. Inicialmente, todas as amostras foram aquecidas de 30 a 110°C, a 10°C/min., para eliminação de umidade. Posteriormente, as amostras de cisplatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, mistura física de hidroxipropil- β -ciclodextrina e cisplatina e o complexo de associação cisplatina/hidroxipropil- β -ciclodextrina liofilizado foram submetidas aos seguintes intervalos de aquecimento, respectivamente: 30-260°C; 30-310°C; 30-310°C e 30-350°C. Os termogramas dessas diferentes amostras estão representados na Figura 1. A Figura 1 mostra os termogramas da cisplatina (1), do complexo de associação cisplatina/hidroxipropil- β -ciclodextrina (2), da hidroxipropil- β -ciclodextrina (3) e da mistura física de cisplatina e hidroxipropil- β -ciclodextrina (4).

Exemplo 4 – Preparação dos lipossomas pH-sensíveis contendo o complexo de associação cisplatina/hidroxipropil- β -ciclodextrina

Um filme lipídico foi obtido a partir de alíquotas clorofórmicas de dioleoilfosfatidiletanolamina, hemisuccinato de colestera e diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (concentração lipídica 120 mM, razão molar 5,7:3,8:0,5, respectivamente), como descrito no exemplo 1. O filme lipídico formado foi hidratado com uma solução de NaCl 0,9 g%, e em seguida alcalinizado a pH em torno de 12. Os lipossomas obtidos foram calibrados mediante sua extrusão através de filtros de policarbonato de 0,4 e

0,2 μm (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) (5 vezes para cada ciclo). O pH da dispersão lipossomal foi ajustado para aproximadamente 9,0. Posteriormente, os lipossomas calibrados foram misturados ao complexo de associação cisplatina/hidroxipropil- β -ciclodextrina, razão molar 1:11, em proporção de volume igual a 1:1,9, respectivamente. Finalmente, a mistura obtida foi submetida a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 35°C.

O complexo de associação cisplatina/hidroxipropil- β -ciclodextrina não encapsulado foi separado dos lipossomas por ultrafiltração em membrana Ultrafree-MC (UFC 30 VUOO, Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) a 12.000 g, por 30 minutos. A porção filtrada obtida foi em seguida filtrada em membrana Ultrafree-MC (PLTK 30 K Millipore, Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA), a 5000 g, por 60 minutos. A taxa de encapsulação da cisplatina foi calculada pela diferença da concentração da cisplatina presente nos lipossomas não purificados e na porção obtida após filtração (cisplatina não encapsulada). O doseamento da cisplatina foi realizado utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. O diâmetro dos lipossomas foi medido utilizando-se o nanosizer N4 (Coultronics, Margency, França). A taxa de encapsulação do complexo cisplatina/hidroxipropil- β -ciclodextrina foi igual a 42,8% (número de amostras = 3; d.p. = $\pm 3,9$).

Exemplo 5 – Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos lipossomas pH-sensíveis de cisplatina

A cultura de células da linhagem A459 em fase logarítmica de proliferação foi tripsinizada e semeada em placas de 96 cavidades (Nalge Nunc International, Dinamarca), suspensas em 100 μL do meio de cultura apropriado enriquecido com 10 % de SFB e incubadas a 36,5 °C em estufa (Sanyo Electric Company Ltda., Japão) com atmosfera úmida contendo 2,5 % (v/v) de dióxido de carbono. O número de células/cavidade foi de 5×10^3 . Após 24 horas de cultivo, as células foram submetidas ao tratamento com a cisplatina livre e encapsulada em lipossomas pH-sensíveis convencionais e furtivos numa concentração igual a $3,73 \times 10^{-6}$ mol/L, correspondente a sua CI_{50} . O

tratamento foi realizado em três dias consecutivos, com a substituição do meio a cada novo tratamento. Os controles foram realizados substituindo-se a cisplatina por igual volume do respectivo meio de cultura. Após 72 horas do tratamento inicial, a viabilidade celular foi medida através da redução do MTT.

- 5 Primeiramente, foram adicionados 10 μ L da solução a 5 mg/mL do sal de tetrazólio em cada cavidade da placa de cultivo. Após 4 horas, os cristais de MTT foram solubilizados em 150 μ L de DMSO. A leitura da densidade ótica foi realizada no comprimento de onda de 600 nm (Espectrofotômetro Stat Fax 2100, Awariness Technoloy INC, EUA). Os cálculos da porcentagem de
- 10 viabilidade celular para as células tratadas com a cisplatina livre e encapsulada em lipossomas pH-sensíveis convencionais e furtivos foram realizados, a partir das médias das respectivas absorbâncias considerando-se o valor médio da absorbância do grupo controle como 100 % de viabilidade. A comparação entre as médias dos valores da % de inibição celular foi realizada através do
- 15 Teste t de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$. Os resultados estão representados na Tabela 4. Na Tabela 4 são mostrados os tratamentos aos quais as células foram submetidos, a densidade ótica encontrada e a porcentagem de inibição celular.

Tabela 4 – Atividade citotóxica da cisplatina livre e encapsulada em lipossomas pH-sensíveis convencionais e furtivos

Linhagem Celular	Tratamento	Densidade Ótica (DO)	% inibição celular
A549	- (grupo controle)	0,2678 \pm 0,038	0
	Cisplatina livre	0,1198 \pm 0,014	55,26
	Lipossomas pH-sensíveis convencionais de cisplatina	0,0738 \pm 0,022	72,44*
	Lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina	0,0696 \pm 0,024	74,01*

* A atividade citotóxica é significativamente maior do que a da cisplatina livre ($p < 0,05$).

REIVINDICAÇÕES

1. Lipossomas pH-sensíveis **caracterizados** por compreenderem agente antineoplásico, preferencialmente a cisplatina, sob a forma livre ou complexada com ciclodextrina; um fosfolípide formador de fase não lamelar,
5 preferencialmente a dioleoilfosfatidiletanolamina; um agente estabilizador de bicamada lipídica, preferencialmente o hemisuccinato de colessterila; e opcionalmente um fosfolípide acoplado a polímero hidrofílico de peso molecular compreendido entre 1000 a 5000 Daltons, preferencialmente diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol.
- 10 2. Lipossomas de acordo com a reivindicação 1 **caracterizados por** possuírem uma concentração lipídica total compreendida entre 20 a 40mM, sendo a dioleoilfosfatidiletanolamina em quantidade correspondente a 60 a 75% da concentração lipídica total, mais preferencialmente 60 %; 25 a 40% de hemisuccinato de colessterila, mais preferencialmente 40%; e opcionalmente 5 a
15 15 % da concentração lipídica total correspondente a diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol, preferencialmente 5 %.
3. Lipossomas conforme as reivindicações de 1 a 2 **caracterizados** por possuírem diâmetros de vesículas compreendidos entre 80 a 500 nm.
- 20 4. Processo de encapsulação de agentes antineoplásicos nos lipossomas descritos nas reivindicações de 1 a 3 **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:
 - a) dispersão da solução contendo pelo menos um agente antineoplásico, preferencialmente cisplatina, em éter etílico previamente alcalinizado com
25 solução de NaOH contendo um fosfolípide formador de fase não lamelar, preferencialmente a dioleoilfosfatidiletanolamina; um agente estabilizador de bicamada lipídica, preferencialmente o hemisuccinato de colessterila; e opcionalmente um fosfolípide acoplado a polímero hidrofílico de peso molecular compreendido entre 1000 a 5000 Daltons, preferencialmente
30 diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol;
 - b) evaporação do solvente orgânico.

5. Processo de encapsulação de agentes antineoplásicos nos lipossomas descritos nas reivindicações de 1 a 3 **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:

- 5 a) encapsulação do agente antineoplásico, preferencialmente cisplatina, em ciclodextrina, preferencialmente hidroxipropil- β -ciclodextrina nas razões molares de cisplatina/ hidroxipropil- β -ciclodextrina iguais a 1,0:2,0 a 1,0: 20,0, preferencialmente 1,0:4,0 a 1: 18,0, ainda mais especificamente 1: 11,0;
- 10 b) preparo prévio de lipossomas brancos contendo um fosfolípide formador de fase não lamelar, preferencialmente a dioleoilfosfatidiletanolamina; um agente estabilizador de bicamada lipídica, preferencialmente o hemisuccinato de colestera; e opcionalmente um fosfolípide acoplado a polímero hidrofílico de peso molecular compreendido entre 1000 a 5000 Daltons, preferencialmente diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol, apresentando um pH em torno de 12, calibrados em membranas de
- 15 policarbonato de tamanho variado de poro, com ajuste do pH para 9;
- c) adição da solução obtida em “a” aos lipossomas obtidos em “b” e realização de congelamento e descongelamento a fim se de promover a encapsulação.

Fig.1

30

