

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

(21) **PI0905627-0 A2**



(22) Data de Depósito: 21/12/2009
(43) Data da Publicação: 23/08/2011
(RPI 2120)

(51) Int.Cl.:

A61K 9/51 2006.01
A61K 31/409 2006.01
A61K 47/30 2006.01
A61P 43/00 2006.01
A61P 35/00 2006.01

(54) Título: NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E DE CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA PROLONGADA CONTENDO CLORO-ALUMÍNIO FTALOCIANINA PARA TERAPIA FOTODINÂMICA DO CÂNCER

(73) Titular(es): Universidade Federal de Ouro Preto, Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo

(72) Inventor(es): Antônio Claudio Tedesco, Carina Silva de Paula, Vanessa Carla Furtado Mosqueira

(57) Resumo: NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E DE CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA PROLONGADA CONTENDO CLORO-ALUMÍNIO FTALOCIANINA PARA TERAPIA FOTODINÂMICA DO CÂNCER A presente invenção representa uma forma de veiculação, constituída de nanocápsulas, contendo ftalocianina de cloro-alumínio (AIClPc), um agente fotossensibilizador que pode ser utilizado na Terapia Fotodinâmica (TFD) do câncer e de outras doenças. A metodologia de preparo consiste modificação do método de nanoprecipitação por adição de etanol (5 a 75%) à fase orgânica durante o processo de encapsulação com conseqüente alteração das proporções entre fase aquosa e orgânica. Trata-se a invenção de obtenção das nanocápsulas convencionais (PLA) e furtivas (PLA-PEG) contendo a ftalocianina de cloro-alumínio como agente fotossensibilizador para aplicação na terapia fotodinâmica de tumores profundos e superficiais, pelo método de deposição interfacial de um polímero preformado (nanoprecipitação).



**NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E DE CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA
PROLONGADA CONTENDO CLORO-ALUMÍNIO FTALOCIANINA PARA
TERAPIA FOTODINÂMICA DO CANCER**

A presente invenção representa uma forma de veiculação, constituída de
5 nanocápsulas, contendo ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc), um agente
fotossensibilizador que pode ser utilizado na Terapia Fotodinâmica (TFD) do câncer e de
outras doenças.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento promissor para uma variedade de
doenças oncológicas, dermatológicas e oftálmicas (Levy *et.al.*,1996, Lunardi *et al.*, 2005).
10 Essa terapia baseia-se na aplicação tópica ou sistêmica de um composto fotossensibilizador
(FS) que, após ser irradiado, utilizando-se uma fonte de luz de comprimento de onda
adequado e na presença de oxigênio, leva a formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e espécies
reativas de oxigênio que podem oxidar lipídios, aminoácidos e proteínas induzindo necrose
e apoptose celular.

15 O Photofrin® US 7,371,742, um derivado hematoporfirínico (HpD), é o mais
utilizado atualmente na Terapia Fotodinâmica. Entretanto, apresenta alguns inconvenientes,
como a absorção máxima em comprimentos de onda relativamente curtos (630nm), o que
leva a uma pobre penetração da luz pelos tecidos, e a elevada taxa de retenção na pele, o
que induz a uma prolongada fotossensibilidade cutânea que pode permanecer por 6 a 8
20 semanas após TFD (Razum *et al.*, 1987).

Novos compostos fotossensibilizadores têm recebido, recentemente, considerável
atenção devido ao seu potencial uso como fotossensibilizadores de segunda-geração. Esses
compostos de segunda- geração, diferentemente dos derivados porfirínicos, são compostos
puros e bem caracterizados. Além disso, são efetivos geradores de oxigênio singlete e
25 absorvem luz entre 650 a 800nm, faixa de comprimento de onda de elevada penetração nos
tecidos. (Calzavara-Pinton *et al.*,2007). Entre os mais promissores fotossensibilizadores de
segunda geração estão as ftalocianinas.

Nesse trabalho foi utilizada a ftalocianina complexada com alumínio, a cloro-
alumínio ftalocianina (AlClPc). A incorporação do alumínio como metal central na
30 estrutura da ftalocianina resulta em um complexo com alto rendimento quântico do estado
triplete e longo tempo de vida no estado triplete, propriedades fotofísicas favoráveis para
aplicação na TFD. Além disso, o AlClPc é um composto quimicamente estável e facilmente
sintetizado em grandes quantidades, produzindo um único produto isomérico. O AlClPc,

entretanto, é um composto altamente lipofílico e, embora isso facilite sua passagem através das membranas celulares, a baixíssima solubilidade em água desse composto impede sua administração sistêmica, principalmente pela via endovenosa.

Substituintes polares são freqüentemente ligados às moléculas de ftalocianinas para
5 solucionar os problemas de solubilidade causados pela sua elevada hidrofobicidade. Entretanto, estudos de eficácia *in vivo* das ftalocianinas de alumínio sulfonadas em comparação com a não sulfonada foram realizados e, dentre os compostos testados, a **ftalocianina de alumínio** não sulfonada, formulada em Cremophor, mostrou-se mais efetiva (Chan *et al.*, 1997). Assim, a alternativa mais interessante ao problema da
10 solubilidade desses compostos seria a sua incorporação à sistemas carreadores nanométricos que permitem uma alta dispersibilidade do fármaco em água e adequabilidade para administração por vias parenterais. A ftalocianina de alumínio já foi incorporada a lipossoma (CZ298978) para sua utilização na Terapia Fotodinâmica do câncer e outras doenças. Entretanto, os lipossomas apresentam alto custo de produção, reduzida eficiência
15 de encapsulação e baixa estabilidade de armazenamento (Barrat, 2000). Dessa forma, no presente trabalho, foi realizado o desenvolvimento de um processo de obtenção de outro tipo de carreador nanoestruturado para a veiculação da ftalocianina de cloro-alumínio, as nanocápsulas poliméricas.

Nanocápsulas são sistemas reservatórios de fármacos constituídos de um núcleo
20 oleoso envolto por uma parede polimérica (Legrand *et al.*, 1999). As nanocápsulas geralmente apresentam elevada eficiência de encapsulação para compostos lipofílicos, além de possuírem baixo conteúdo de polímero na formulação total, quando comparadas com outros vetores, como as nanoesferas, por exemplo. As NC são formadas por polímeros estáveis, de baixa toxicidade e que consistem de materiais biocompatíveis e biodegradáveis,
25 os quais são degradados *in vivo* em fragmentos menores facilmente excretados, como o ácido lático. As nanocápsulas são consideradas, portanto, carreadores de escolha para a administração intravenosa de fármacos altamente lipofílicos (Mosqueira *et al.*, 2001, Mosqueira *et al.*, 2006).

As nanocápsulas podem ser classificadas como convencionais ou com circulação
30 sanguínea prolongada (nanocápsulas furtivas). As nanocápsulas convencionais são rapidamente capturadas pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) concentrando os fármacos encapsulados em órgãos como fígado e baço (Mosqueira *et al.*, 2001b). Por outro lado, as nanocápsulas furtivas, ou com a superfície modificada,

representam um tipo especial de nanoestrutura com cadeias de polietilenoglicol (PEG) ligadas covalentemente ao núcleo hidrofóbico polimérico das nanocápsulas (Mosqueira *et al.*, 2001a). A ligação de cadeias hidrofílicas de PEG à superfície das nanocápsulas possibilita que estas sejam envolvidas por uma camada polimérica altamente solvatada. Essas partículas uma vez injetadas pela via intravenosa, reduzem a opsonização e o rápido reconhecimento e captura pelas células do SFM (Mosqueira *et al.*, 2001a e 2001b, Gref *et al.*, 1994 e 1995).

A arte anterior comumente utilizada para produção de nanocápsulas foi descrita por Fessi *et al.*, 1989 (US 5,049,322); baseada na deposição interfacial de um polímero pré-formado seguida do deslocamento do solvente, também denominado de nanoprecipitação. O processo descrito por Fessi *et al.*, 1989 consiste da mistura de uma fase orgânica, **constituída por apenas um solvente miscível com água**, com uma fase aquosa contendo um surfactante hidrofílico. Para a preparação das nanocápsulas por nanoprecipitação são utilizados polímeros geralmente na faixa de 0,2 a 2% (m/m) como determinado anteriormente pela patente EP 1531800 A2. Surfactantes hidrofílicos e lipofílicos também são utilizados, usualmente de 0,2 a 2% (m/m) e os óleos empregados podem ser vegetais ou minerais, devendo apresentar ausência de toxicidade, não serem capazes de degradar ou dissolver o polímero, além de apresentarem alta capacidade de solubilizar o fármaco em questão (Legrand *et al.*, 1999).

Entretanto, a utilização da arte anterior, como descrita pelas patentes US 5,049,322 e EP 1531800 A2, não possibilita a encapsulação da ftalocianina de cloro alumínio uma vez que esta substância é insolúvel em todos os solventes empregados nas patentes descritas. Assim, na utilização do método citado anteriormente ocorre a precipitação da ftalocianina antes da formação das nanoestruturas, ficando o fotossensibilizador precipitado no fundo da formulação e, portanto, não sendo incorporado às nanocápsulas.

Dessa forma, para obtenção de nanocápsulas contendo ftalocianina de cloro alumínio, foi necessário modificar os métodos descritos anteriormente, através da adição de um novo solvente atóxico à fase orgânica e do estudo de uma nova relação de proporção entre as fases orgânica e aquosa, o que representa um desafio tecnológico devido à insolubilidade desta substância em todos os solventes utilizados nas patentes e artigos anteriormente descritos

A **presente invenção**, portanto, está baseada na obtenção de formulações de nanocápsulas contendo o AlClPc, através da modificação da arte descrita na patente EP

1531800 A2 e obtidas à partir do ácido poli-láctico (PLA) e dos polímeros dibloco do ácido poli-láctico com cadeias de monometoxi-poli(etilenoglicol) de 5000-20000 Daltons (PLA-PEG). As primeiras foram assim chamadas de nanocápsulas de PLA (NC PLA), com superfície mais hidrofóbica, e as segundas de nanocápsulas furtivas (NC PLA-PEG), pois
5 possuem uma superfície mais hidrofílica que aumenta o tempo de circulação sanguínea dessas nanopartículas.

Para preparação de nanocápsulas de PLA na ausência de fármacos, o polímero poli(*D,L*-ácido láctico) (PLA) foi dissolvido e aquecido de 30 a 80°C em uma solução de acetona contendo lecitina de soja e triglicerídeo de cadeia média. Essa solução foi vertida
10 em uma solução aquosa contendo poloxamer 188. A mistura resultante foi mantida sob agitação para permitir a formação das nanocápsulas. Posteriormente, o excesso de solvente foi evaporado em uma temperatura de 30 a 80°C.. As nanocápsulas de superfície modificada (NC PLA-PEG) foram preparadas pelo mesmo método descrito acima com modificações introduzidas segundo o método descrito por Mosqueira *et al.* (2001a),
15 entretanto, utilizando-se o co-polímero PLA-PEG contendo um bloco de monometoxi-PEG de 5000-20000Daltons. Neste caso as nanocápsulas de PLA-PEG foram obtidas na ausência do poloxamer.

Para preparação de NC de PLA e NC de PLA-PEG contendo o fotossensibilizador, além da ftalocianina, proporções específicas de etanol (5 a 75%) foram adicionadas à fase
20 orgânica durante o processo de encapsulação, possibilitando a obtenção de NC contendo de 0,01 a 0,2mg/mL de AlClPc.

O etanol representa um bom solvente para o AlClPc e um mal solvente para o polímero, o que induz a precipitação precoce dos polímeros e a formação de nanocápsulas com tamanho reduzido, sendo esta uma grande vantagem tecnológica da presente invenção,
25 pois o reduzido tamanho das nanocápsulas possibilita maior penetração nos tecidos tumorais. Além disso, o etanol é um solvente que em pequenas concentrações é permitido para injeções parenterais (Wide e Werle, Handbook of Pharmaceutical Excipients) pela sua baixa toxicidade e rápida eliminação pelo organismo.

Estas formulações ainda possuem como vantagens principais a simplicidade e a
30 rapidez na preparação, a obtenção de partículas de tamanho muito reduzido (100-200nm) e com excelente polidispersão (inferior a 0,15), a liberação prolongada da AlClPc, a estabilidade do produto polimérico em meios biológicos e a facilidade de produção na forma estéril e de transposição de escala para produção e posterior comercialização.

Comparada com a metodologia conhecida, o método de formulação de acordo com a invenção também permitiu a obtenção de um processo com elevada eficiência e rendimento de encapsulação (%)

Ressalta-se também o fato dessas nanocápsulas serem potencialmente utilizadas na
5 Terapia Fotodinâmica de tumores malignos superficiais e profundos, conforme os resultados dos estudos pré-clínicos realizados e constantes deste documento e de outras enfermidades onde a morte celular e necrose/apoptose de tecidos, células, bactérias, vírus ou parasitas são necessárias. Assim, a presente invenção pode ser utilizada no tratamento de enfermidades cutâneas, como ceratoses actínicas, carcinomas basocelulares e
10 espinocelulares, doença de Bowen, acne, envelhecimento causado pelo sol, enfermidades odontológicas, como combate às bactérias e inflamações do nervo, doença periodontal, prevenção de cárie, tratamentos da gengiva e canal e, principalmente, em oncologia, como no tratamento de cânceres de boca, laringe, esôfago, estômago, pulmão, bexiga, próstata, cervical, displasia cervical e redução de tumores obstrutivos em pacientes
15 com câncer de esôfago. Além de sua aplicação em outras enfermidades como psoríase, degeneração macular da retina, condições auto-imunes, arteriosclerose e reestenose, remoção de verrugas; tratamento de micoses fungóides, destruição de infestações bacterianas resistentes a tratamentos tradicionais à base de antibióticos e desativação de vírus como da herpes (Herpes simplex -1, herpes simplex - 2, varicela zoster).

20 **A invenção, portanto, consiste na obtenção das nanocápsulas convencionais (PLA) e furtivas (PLA-PEG) contendo a ftalocianina de cloro-alumínio como agente fotossensitizador para aplicação na terapia fotodinâmica de tumores profundos e superficiais, pelo método de deposição interfacial de um polímero preformado (nanoprecipitação) modificado pela utilização do etanol como co-solvente na fase**
25 **orgânica. A metodologia é simples, obtendo-se nanocápsulas com redução significativa no tamanho das partículas (100 a 200nm), com alto rendimento de encapsulação (~100%) e com alta eficiência do processo (80-87%) em uma só etapa, sem a necessidade de técnicas de purificação posteriores.**

A eficiência de encapsulação objetiva determinar a eficiência do processo utilizado
30 para a obtenção das nanoestruturas. A eficiência, de encapsulação das nanocápsulas foi calculada pela quantidade de AlClPc encapsulado na suspensão de NC dividido pela quantidade de AlClPc pesado colocado na suspensão de NP x 100.

A eficiência de encapsulação foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de Encapsulação} = \frac{\text{Quantidade total de fármaco encapsulado}}{\text{Quantidade de fármaco pesado colocado na NC}} \times 100$$

5

O rendimento de encapsulação objetiva determinar o teor de fármaco incorporado à nanopartícula em relação ao total de fármaco presente na formulação. O rendimento de encapsulação foi calculado pela diferença entre a quantidade total de AICIPc na suspensão coloidal e a quantidade de AICIPc livre solúvel na fase aquosa externa, dividida pela quantidade total de AICIPc na suspensão x 100.

10

O rendimento de encapsulação foi calculado, portanto, pela seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento(\%)} = \frac{(\text{fármaco total na suspensão} - \text{fármaco livre solúvel})}{\text{fármaco total na suspensão}} \times 100$$

15

A porcentagem de AICIPc precipitado nas formulações de nanocápsulas também foi determinado.

Observa-se, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, que o aumento da % de etanol adicionado à fase orgânica durante a preparação das nanocápsulas convencional e furtiva foi favorável ao processo de encapsulação de ambas as formulações, possibilitando a obtenção de nanopartículas com maior eficiência de encapsulação e menor porcentagem de fármaco precipitado. Assim, os dados apresentados na tabela 1 comprovam que a nova técnica empregada na presente invenção, caracterizada pela adição de novo solvente à fase orgânica durante o processo de encapsulação, possibilita o aumento da eficiência e do rendimento de encapsulação, bem como a diminuição da % de composto precipitado na formulação.

25

Tabela 1: Eficiência de encapsulação, porcentagem de fármaco precipitado e teor de encapsulação de formulações de NC com mesma concentração de AICIPc, mas preparadas com porcentagens diferentes de etanol.

Formulação de NC ^a	Concentração de AICIPc (mg/mL)	% Etanol na formulação ^b	Eficiência de encapsulação ± DP ^d (%)	% AICIPc precipitado ± DP ^d	Rendimento de encapsulação (%) ^c
NC	0,1	50	59,5 ± 2,0	8,8 ± 0,6	100
PLA	0,1	70	80,9 ± 2,0	2,0 ± 2,0	100

NC	0,1	50	66,5 ± 0,6	17,3 ± 1,3	100
PLA-PEG	0,1	70	87,5 ± 1,4	0,13 ± 0,1	100

^a Formulações de nanocápsulas constituídas por Poli(*D,L*-ácido-lático) (PLA) ou NC de PLA com cadeias de Polietilenoglicol ligadas à superfície (NC de PLA-PEG); ^b % de etanol na fase orgânica durante a preparação das formulações; ^c Não foi encontrado AIClPc livre solúvel na suspensão coloidal ou aderido a membrana de ultrafiltração; ^d Desvio Padrão (n=3).

5

Outras vantagens das nanoestruturas obtidas de acordo com a invenção são verificadas através da caracterização físico-química das formulações.

A caracterização físico-química das formulações de nanocápsulas é de extrema importância, pois permite determinar o perfil de distribuição das nanoestruturas, bem como inferir em relação à estabilidade das formulações preparadas e a interação destas com as células do SFM após a administração i.v. (Barratt, 2000, Legrand *et al.*, 1999). A análise da distribuição de tamanho das nanopartículas, a determinação do potencial zeta (ζ) e a cinética de liberação do fármaco a partir das nanoestruturas são técnicas geralmente utilizadas nessa caracterização (Legrand *et al.*, 1999).

A distribuição de tamanho e o índice de polidispersão das suspensões de nanocápsulas foram determinados, por espectroscopia de correlação fotônica (PCS), utilizando um equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, UK). O potencial zeta, medido no mesmo aparelho, foi determinado pela técnica de microeletroforese associada à anemometria do laser doppler (ALD). As medidas de tamanho e potencial zeta foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão. O índice de polidispersão determinado pelo equipamento reflete a homogeneidade no tamanho das nanopartículas presentes na amostra, sendo que as amostras que apresentaram índice de polidispersão inferior a 0,3 são consideradas monodispersas (Mosqueira *et al.*, 2001a).

O diâmetro médio, o índice de polidispersão e o potencial zeta das partículas foram avaliados nas formulações de nanocápsulas convencionais (PLA NC) e furtivas (PLA-PEG NC), vazias e contendo a ftalocianina de cloro-alumínio. É importante ressaltar que as NC vazias foram preparadas sem adição de etanol à fase orgânica e sem alteração das proporções estabelecidas entre a fase aquosa e orgânica, alterações realizadas na preparação das NC contendo AIClPc.

Tabela 2: Características físico-químicas das formulações de nanocápsulas vazias e contendo AIClPc

Formulações	AIClPc	Tamanho	Índice de	Potencial Zeta
-------------	--------	---------	-----------	----------------

<i>de Nanocápsulas</i>	<i>(mg/mL)</i>	<i>Médio das Partículas+DP (nm)</i>	<i>Polidispersão</i>	<i>± DP (mV)</i>
NC PLA	0,00	244,5 ± 3,5	0,145	-55,6 ± 4,6
NC PLA	0,05	200,8 ± 2,4	0,107	-61,0 ± 0,3
NC PLA	0,10	199,6 ± 1,3	0,097	-56,0 ± 4,8
NC PLA	0,15	207,5 ± 3,9	0,067	-51,2 ± 12
NCPLA	0,20	198,6 ± 1,5	0,122	-51,8 ± 2,1
NC PLA-PEG	0,00	197,6 ± 2,18	0,153	-61,8 ± 1,8
NC PLA-PEG	0,05	160,7 ± 0,85	0,148	-49,8 ± 7,0
NC PLA-PEG	0,10	189,6 ± 0,05	0,126	-47,9 ± 3,8
NC PLA-PEG	0,15	135,5 ± 0,17	0,163	-49,9 ± 3,2
NC PLA-PEG	0,20	138,6 ± 0,75	0,126	-37,2 ± 4,1

5 Formulações de nanocápsulas convencionais, constituídas por Poli (*D,L*-ácido-lático) (NC PLA) e nanocápsulas furtivas constituídas de PLA com cadeias de Polietilenoglicol ligadas covalentemente à superfície (NC PLA-PEG). As NC vazias foram preparadas sem adição de etanol na fase orgânica. As NC contendo AICIPc foram preparadas adicionando de 5 a 75% de etanol na fase orgânica. Os resultados apresentam a média ± desvio padrão (n=3).

10 Observa-se na tabela 2 que o tamanho médio das nanocápsulas variou de 138,6 a 244,5nm, ocorrendo uma diminuição significativa ($p<0,05$) no tamanho das nanoestruturas quando o AICIPc e o etanol foram incorporados às nanocápsulas convencionais e furtivas, uma vez que as NC vazias foram preparadas sem adição de etanol à fase orgânica. Observa-

15 se também que as formulações de nanocápsulas de PLA-PEG tiveram um tamanho médio significativamente ($p<0,05$) reduzido em relação às formulações de nanocápsula convencional. O Índice de Polidispersão obtido mostra que as formulações preparadas apresentaram-se monodispersas, com valores menores que 0,15, e também muito homogêneas ($<0,3$) quanto à distribuição de tamanho (Legrand *et al.*, 1999; Couvreur *et al.*, 2002; Mosqueira *et al.*, 2006; Assis *et al.*, 2008) indicando uma população de partículas altamente monodispersa, ideal para formulações de uso parenteral e mesmo endovenoso. Os dados da tabela 2, portanto, apresentam-se confirmando a idéia de que a adição de etanol à fase orgânica durante a preparação das NC induz a precipitação precoce dos polímeros e a formação de nanocápsulas com tamanho reduzido.

20 Alguns autores têm demonstrado que o diâmetro médio das nanoestruturas influencia em sua biodistribuição, pois partículas maiores que 300nm e menores que 70nm são rapidamente capturadas pelas células do sistema fagocitário, acumulando no fígado e no baço. Por outro lado, partículas com 150 a 200nm foram encontradas por longo tempo na circulação (Litzinger *et al.*, 1994; Owens e Peppas, 2006). Dessa forma, as nanocápsulas

25 obtidas pela presente invenção apresentaram valores de diâmetro desejáveis para administração intravenosa, com possibilidade de circulação sanguínea mais prolongada e

captação aumentada em tecidos tumorais que apresentam o efeito de permeação e retenção aumentados (“EPR effect”) devido ao aumento da permeabilidade capilar e ao aumento da circulação sanguínea local nessas regiões.

O potencial ζ foi utilizado com o objetivo de detectar alterações na carga superficial das partículas devido à adição da ftalocianina às nanoestruturas. A pequena variação no valor de potencial ζ para a nanocápsula de PLA sugere que a superfície das nanocápsulas com AlClPc tem a mesma composição das nanocápsulas brancas, ou seja, nessa condição parece que a maior parte do fármaco encontra-se encapsulado no núcleo oleoso, sem influenciar significativamente na interface (Tabela 2). Para as nanocápsulas de PLA-PEG, entretanto, a adição de AlClPc às nanoestruturas levou a uma grande redução no valor absoluto de potencial ζ , sugerindo que, nessa formulação, a ftalocianina encontra-se associada a superfície da parede polimérica (Tabela 2).

A cinética de liberação do AlClPc incorporado às nanocápsulas foi também investigada. Como o AlClPc apresenta-se muito insolúvel em água, o método “external sink”, capaz de proporcionar uma condição “sink” perfeita, descrito por Chorny *et al.*, 2002, foi escolhido para o estudo de liberação. A condição sink no processo de liberação foi estabelecida permitindo que a solubilidade do composto fosse garantida no meio de liberação, o que possibilita evidenciar o real efeito de retenção do fármaco pelo vetor. O n-octanol foi estabelecido como meio externo de liberação devido à semelhança entre sua lipofilia e a lipofilia das membranas biológicas. Além disso, o n-octanol é um bom solvente para a ftalocianina estudada e um não-solvente absoluto para as nanocápsulas, permitindo seu uso como fase aceptora na liberação.

A liberação do AlClPc das nanocápsulas foi acompanhada por um período de 168 horas ou 7 dias.

A figura 1 mostra o perfil de liberação *in vitro* do AlClPc incorporado nas nanocápsulas nos primeiros 7 dias. **A partir desse estudo de liberação nota-se que esses tipos de carreadores de fármaco possibilitaram uma lenta liberação da ftalocianina por mais de uma semana.** Sendo que após o período de sete dias, somente 39,1% e 52,5% de AlClPc foram liberados das nanocápsulas de PLA-PEG e PLA (PM=42kDa), respectivamente. Assim, outra grande vantagem do presente invento é a obtenção de NC que possibilitem a liberação prolongada e gradual da ftalocianina de forma a permitir a manutenção da sua concentração plasmática durante um longo período de tempo.

Foram realizados também estudos espectroscópicos e fotofísicos da ftalocianina de cloro-alumínio incorporada nas formulações de nanocápsulas para verificação da manutenção das propriedades fotofísicas desse composto após sua encapsulação. Para isso, foi determinado o espectro de absorção e emissão de fluorescência, a medida de fluorescência resolvida no tempo (τ_F), o rendimento quântico de fluorescência (Φ_f), o espectro de absorção transiente e o tempo de vida no estado excitado tripleto (τ_T).

A tabela 3 apresenta os resultados dos estudos fotofísicos do AlClPc livre e incorporado às formulações de nanocápsula convencional e furtiva. O espectro de absorção do AlClPc encapsulado foi semelhante ao espectro do AlClPc em etanol (Figura 2), sendo que o AlClPc exibiu uma forte absorbância na região do vermelho, com absorção máxima em 676nm quando extraído das nanocápsulas e 670nm em etanol (Tabela 3). Além disso, em todas as formulações, apresentou banda Q na região de 600 a 700nm e banda Soret em 340nm. A semelhança no perfil de absorção demonstra que as moléculas de AlClPc permaneceram em sua forma monomérica, ou seja, não sofreram agregação após a encapsulação. Uma vez que a formação de agregados de moléculas de AlClPc alteraria o perfil espectral da ftalocianina, com um alargamento de Banda Q visível.

Tabela 3: Resultados da caracterização fotofísica do AlClPc livre em etanol e incorporado em nanocápsulas poliméricas convencionais e furtivas.

Formulações de AlClPc	UV-vis (nm) ^a	λ EX (nm) ^b	λ EM (nm) ^c	τ_f (ns) \pm DP ^d	τ_f (%) ^e	Φ_f ^f	τ_T (μ s) \pm DP ^g
Livre em etanol	670	610	679	7,57 \pm 0,06	100	0,81	0,80*
NC de PLA (42kDa)	676	610	680	5,80 \pm 0,09	100	0,72	1,37 \pm 0,03
NC de PLA	676	610	680	5,92 \pm 0,07	100	0,79	1,50 \pm 0,05
NC de PLA- PEG	676	610	680	5,85 \pm 0,08	100	0,80	1,41 \pm 0,06

^a Comprimento de onda de absorção máxima na região do ultravioleta-visível; ^b comprimento de onda de excitação; ^c comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência; ^d tempo de vida de fluorescência; ^e % distribuição da população fluorescente; ^f rendimento quântico de fluorescência; ^g tempo de vida do estado tripleto; *Nunes et al.,2004.

A incorporação do AlClPc nas formulações de nanocápsulas, como apresentado na Tabela 3, levou a uma pequena diminuição no tempo de vida de fluorescência desse composto. Enquanto, os valores de rendimento quântico de fluorescência do AlClPc livre

em etanol e nas formulações de nanocápsulas apresentaram-se próximos (Tabela 3), permitindo inferir que o fotossensibilizador não sofreu degradação durante o processo de encapsulação. Para todas as formulações preparadas, obteve-se um perfil monoexponencial da curva de decaimento tripleto, tendo-se, então, uma única população de AlClPc excitado com um único tempo de vida no estado tripleto. O AlClPc incorporado às nanocápsulas não sofreu grandes alterações em suas propriedades fotofísicas após o processo de encapsulação, o que demonstra que as formulações utilizadas e a metodologia empregada para a encapsulação da ftalocianina mantiveram as características do agente fotossensibilizador, necessárias a Terapia Fotodinâmica. **Além disso, a partir dos resultados apresentados na Tabela 3, observa-se que o tempo de vida do AlClPc no estado excitado tripleto aumentou com a incorporação do mesmo nas formulações de nanocápsulas, o que deve melhorar a eficiência fotodinâmica do composto por aumentar a geração de oxigênio singleto.**

Para verificar a fotoatividade das formulações preparadas, essas foram testadas *in vitro* em cultura de fibroblastos. Os estudos *in vitro* possibilitaram analisar a toxicidade e fototoxicidade das NP contendo AlClPc. Para isso foram utilizados fibroblastos gengivais extraídos com autorização dos pacientes, sendo sua utilização submetida à análise pelo comitê de ética da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Os fibroblastos foram incubados no meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com glucose (Gibco®) sem glutamina, suplementado com soro bovino fetal (BSA) inativado estéril (Cultilab) em uma incubadora monitorada por uma controladora digital, em atmosfera úmida de CO₂ até atingirem confluência. Após confluência, as células foram retiradas das garrafas de cultura e semeadas em placas de 24 poços, sendo . As placas foram incubadas por 24 horas em atmosfera úmida a de CO₂. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e novo meio de cultura já contendo as diferentes formulações com AlClPc na concentração 10µmol foi adicionado após terem sido esterilizadas por filtração. Em seguida, as placas foram novamente incubadas por 4 horas.

Para o estudo de fototoxicidade, antes da irradiação das células, o meio de cultura DMEM foi retirado e outro meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol foi adicionado as placas, evitando-se a influência deste indicador no processo de irradiação do AlClPc. Após a troca do meio de cultura os fibroblastos foram irradiados com as doses de luz de 3,0 e 10,0 J/cm², com o laser de diodo (Eagle da Quantum-tech). A viabilidade celular foi determinada pela atividade mitocondrial utilizando-se o ensaio colorimétrico com MTT

(Mosmann, 1983). Para o estudo de toxicidade das nanopartículas, a viabilidade celular foi também determinada utilizando-se o mesmo ensaio colorimétrico com MTT, entretanto neste caso, as células não foram iluminadas, sendo a toxicidade das formulações determinada no escuro.

5 O AICIPc livre e em NC de PLA não apresentou atividade na ausência de irradiação (Figura 3). Somente para a formulação de NC de PLA-PEG observou-se toxicidade no escuro, ocorrendo diferença significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular em relação ao controle (60%). Acredita-se que essa toxicidade possa ter ocorrido devido à presença das cadeias de PEG na formulação em quantidades superiores as suportadas em cultivo celular
10 *in vitro* ou mesmo pela presença de catalizadores em quantidades traço resultantes da síntese do polímero utilizado na preparação das NC.

A viabilidade celular foi determinada também após exposição das formulações a doses altas e baixas de luz ($3\text{J}/\text{cm}^2$ e $10\text{J}/\text{cm}^2$). Nesse caso, os resultados obtidos mostraram que o AICIPc manteve sua atividade fototóxica após a encapsulação. Como ilustrado na
15 figura 4, após uma irradiação em 670nm com uma dose de luz de $3\text{J}/\text{cm}^2$, a viabilidade celular, posteriormente a incubação por 4 horas com NC de PLA(PM=42kDa), NC de PLA(PM=75kDa) e NC de PLA-PEG contendo AICIPc ($10\mu\text{mol}$) foi, respectivamente, 12,9%, 11,5% e 11,3%. Após a irradiação com a dose de luz de $10\text{J}/\text{cm}^2$, a porcentagem de viabilidade celular foi 13,5% para a incubação com NC de PLA(PM=42kDa) e NC de
20 PLA-PEG e 13,9% para NC de PLA (PM=75kDa), todas as formulações contendo $10\mu\text{mol}$ AICIPc. Não se observou diferença significativa entre as porcentagens de viabilidade celular após a irradiação com $3\text{J}/\text{cm}^2$ ou $10\text{J}/\text{cm}^2$ de luz para as formulações testadas. Logo, a redução da viabilidade celular não foi dose de luz dependente. Os baixos valores de viabilidade celular obtidos após irradiação com ambas as doses de luz indicaram, portanto,
25 que a encapsulação do AICIPc não impediu sua ação fototóxica, mostrando que vetorização não impede a atividade fotodinâmica do composto *in vitro*.

A Terapia Fotodinâmica é comumente utilizada no tratamento de tumores superficiais, com este estudo objetivou-se testar a ação da presente invenção no tratamento de formas mais agressivas de câncer, em tumores mais invasivos, agressivos e profundos.
30 Para isso, a atividade fotodinâmica do AICIPc livre e encapsulado nas formulações de NC convencional e furtiva foi testada *in vivo* na forma do tumor sólido de Ehrlich, um derivado de adenocarcinoma mamário murino espontâneo de crescimento rápido e comportamento extremamente agressivo (Urizzi *et al.*, 2001).

Na realização dos experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25 a 30g) mantidos em ciclos padronizados de claro/escuro e com livre acesso a ração e água. A partir de líquido ascítico de animais inoculados por via intraperitoneal com células de tumor de Ehrlich, foi preparada uma suspensão de células tumorais com. As
 5 células tumorais foram implantadas por via subcutânea no dorso-lateral dos camundongos Swiss fêmeas e o tumor se desenvolveu durante 19 dias até que o mesmo pudesse ser palpável em todos os animais e alcançasse medidas entre 6 a 12 mm, apresentando-se, portanto, em estágio mais avançado.

São poucos os estudos em relação à utilização de ftalocianina de alumínio não
 10 substituída na Terapia Fotodinâmica do câncer, pois o forte caráter hidrofóbico do AlClPc dificulta sua administração *in vivo*. A dose de AlClPc estabelecida nesse estudo foi estimada a partir da literatura existente para derivados solúveis em água desse composto (Chan *et al.*, 1988; Chan *et al.*, 1997; Cubeddu., 2001).

Para o tratamento, os animais foram distribuídos em grupos tendo-se, inicialmente,
 15 22 animais por grupo. Um grupo recebeu Dimetilamina (DMA)/Polietilenoglicol diluído em solução de glicose, sendo o grupo controle. Os demais grupos receberam 0,5 a 6,0mg/kg de AlClPc livre solubilizado em DMA/PEG diluído em solução de glicose, NC convencional de PLA contendo AlClPc na dose de 0,5 a 6,0mg/kg, NC furtiva de PLA-PEG contendo AlClPc também na dose de 0,5 a 6,0mg/kg e AlClPc livre na dose de
 20 6,0mg/kg, entretanto, esse grupo não foi iluminado com o laser. Todas as formulações foram administradas por via endovenosa e, com exceção do grupo não iluminado (AlClPc livre não irradiado), todos os demais grupos foram irradiados 24, 48 e 72 horas após a administração i.v. das formulações com AlClPc. Para a irradiação da lesão neoplásica dos animais, foi utilizado um laser de diodo (Eagle da Quantum-tech) equipado com uma fibra
 25 ótica e ajustado a potência de absorção do composto.

A atividade antitumoral do AlClPc livre e encapsulado foi avaliada com base no peso médio do tumor após necropsia e na variação do volume médio do tumor. Para determinação do peso médio do tumor, 7, 14 e 21 dias após a primeira irradiação de luz, cinco animais por grupo foram sacrificados, o tumor foi retirado e pesado. O tamanho do
 30 tumor foi medido no primeiro dia após o tratamento e duas vezes por semana durante um período de 25 dias. As medidas obtidas foram usadas para calcular o volume do tumor segundo a fórmula:

$$V = \pi/6 \times (d1 \times d2 \times d3)$$

Sendo d1, d2 e d3 as médias dos três diâmetros independentes do tumor.

O volume do tumor foi utilizado também para determinar a % de inibição do crescimento do tumor (%ICT) segundo a fórmula:

$$\%ICT = (V_c - V_t / V_c) \times 100$$

5

Na qual V_c é a média do volume do tumor do grupo controle e V_t é a média do volume do tumor do grupo tratado.

O volume e o peso médio do tumor dos animais foram analisados pelo teste t-Student utilizando o programa Prisma versão 4.0, sendo que esses resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. Para todas as análises realizadas adotou-se intervalo de confiança de 95%, sendo os valores de $p < 0.05$ aceitos como estatisticamente significativos.

Em relação aos animais do grupo controle e do grupo tratado com AlClPc livre não irradiado, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os resultados obtidos para ambos os grupos, demonstrando que a ftalocianina de cloro e alumínio sem irradiação não alterou as características do tumor (Figuras 5 e 7), segundo os parâmetros estudados.

Não foram verificadas também diferenças estatísticas no tratamento dos animais com AlClPc livre em relação ao grupo controle. A ineficácia fotodinâmica do AlClPc livre pode ter ocorrido devido a uma rápida metabolização e excreção desse composto, estando o mesmo presente em baixas concentrações no organismo no momento da irradiação. Quando encapsulado, entretanto, como a ftalocianina encontra-se no interior das nanoestruturas, a sua liberação, metabolização e eliminação seriam mais lentas, permitindo, assim, sua fotoativação. Além disso, as formulações de NC possibilitaram uma administração sistêmica mais segura do AlClPc, visto que, foi observado na necropsia dos animais, que os rins dos camundongos do grupo controle e dos camundongos tratados com AlClPc livre solúvel em DMA:PEG diluído em solução de glicose apresentavam-se bem mais claros que o normal, indicando uma ação nefrotóxica, que não foi verificada nos animais tratados com as NC.

Os valores de peso médio dos tumores retirados dos animais sacrificados uma, duas e três semanas após a primeira dose de luz encontram-se apresentados nas figuras 5 e 6. Observa-se, com base nesses resultados, que somente a partir da terceira semana após o tratamento ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) no peso médio dos tumores não tratados e tratados com de AlClPc encapsulado em NC de PLA. Não foi observada diferença

estatística, em relação ao grupo controle, entre o peso médio dos tumores dos animais tratados com AlClPc em NC PLA-PEG na três semanas subsequentes ao tratamento (Figura 6). Nesses experimentos a variabilidade de peso do tumor foi grande e o número de animais necropsiados, embora correto do ponto de vista estatístico e bioético ($n=5$), foi pequeno para evidenciar claramente esses efeitos. Entretanto, comparando-se cada animal, foi notado que os menores tumores regrediam com mais facilidade e que alguns animais com tumores bem pequenos chegaram a ficar curados após o tratamento, não sendo encontrado o tumor na necropsia. Embora, a TFD tenha apresentado resultados positivos também para tumores maiores. Sugere-se portanto, que o tratamento precoce por TFD com NC pode levar a cura completa de tumores profundos, agressivos e invasivos após irradiação superficial.

A irradiação dos tumores do grupo que recebeu AlClPc encapsulado em NC de PLA e NC de PLA-PEG levou a formação de uma crosta (Figura 10), 24h após a exposição a luz, devido a ocorrência de necrose tecidual intensa na região irradiada (Meerovich *et al.*, 2005). A ocorrência de formação de crosta, após a TFD, foi verificada anteriormente em estudos com hidróxi-alumínio tetra-3-feniltioftalocianina [3- (PhS)4-PcAlOH] incorporada em lipossomas e utilizada no tratamento de tumores sólidos de Ehrlich e tumores subcutâneos obtidos a partir da inoculação de células de P- 388 leucemia em camundongos.

A variação no volume dos tumores dos animais tratados e do grupo controle foi acompanhada até 25 dias após o tratamento. Os resultados de medida do volume do tumor apresentados na figura 7 demonstram que em nenhum momento após a TFD houve diferença significativa no volume dos tumores de camundongos do grupo tratado com AlClPc livre em relação aos do grupo controle.

Para os animais tratados com AlClPc encapsulado em NC de PLA (Figura 8), o volume médio dos tumores dos camundongos diferenciou significativamente ($p < 0,01$) dos do grupo controle desde o primeiro dia após a TFD, sendo que a diferença estatística se manteve até o 21º dia após o tratamento. A figura 9 mostra também que para o AlClPc encapsulado em NC de PLA-PEG, a TFD mostrou-se efetiva nos dias 18 e 21 após o tratamento, quando a diferença no volume do tumor dos animais que receberam AlClPc encapsulado foi estatisticamente menor ($p < 0,05$) em relação aos do grupo controle. Com base nesses resultados de variação no volume do tumor (Figura 9), nota-se que quando encapsulado em NC de PLA-PEG, a atividade antitumoral do AlClPc é percebida mais tardiamente, a partir do 18º dia após a TFD ($p < 0,05$). Acredita-se que esse efeito tardio

possa ser devido a menor quantidade de AIClPc liberado das NC de PLA-PEG no momento das irradiações.

Os valores de volume do tumor foram utilizados também para obtenção da porcentagem de inibição ou indução do crescimento tumoral. Os resultados de inibição ou indução do crescimento são apresentados na tabela 4. Enquanto o AIClPc livre inibiu no máximo 25,17% do crescimento do tumor, o AIClPc encapsulado em NC de PLA na mesma dose mostrou uma inibição máxima de 66,74% (Tabela 4). Ainda para a mesma dose de AIClPc, as NC de PLA-PEG apresentaram o máximo de 54,80% de inibição do crescimento tumoral (Tabela 4). Esses resultados mostram que o processo de encapsulação, além de possibilitar uma administração segura da ftalocianina *in vivo*, melhorou consideravelmente a eficácia fotodinâmica da mesma.

Tabela 4: Efeito sobre o crescimento do tumor sólido de Ehrlich em camundongos, comparado ao controle, após TFD com AIClPc livre e incorporado em nanocápsulas.

Formulação	Inibição do crescimento tumoral (%)							
	Dia após a TFD *							
	1	4	7	11	15	18	21	25
AIClPc livre	-7,16	-9,49	-16,28	-25,17	-17,63	-16,69	-14,75	-15,19
AIClPc –NC PLA	-34,31	-36,09	-57,32	-64,30	-63,74	-66,74	-61,00	-49,08
AIClPc–NC PLA-PEG	-15,57	+9,76	-22,16	-18,63	-38,77	-54,80	-43,25	-45,68

Sinal +: houve estimulação no crescimento do tumor. Sinal -: houve inibição no crescimento do tumor. *Dia após a última dose de luz utilizada na irradiação do tumor.

Com base nos experimentos realizados para caracterização das formulações de NC preparadas pela metodologia proposta no invento e de acordo com os resultados obtidos na determinação da atividade fotodinâmica dessas nanoestruturas *in vitro* e *in vivo*, pode-se concluir que o novo processo utilizado nessa invenção mostrou-se eficiente na produção de NC convencionais e furtivas contendo AIClPc. Uma vez que a nova metodologia empregada possibilitou a obtenção de nanoestruturas de tamanho significativamente reduzido, de elevada eficiência e rendimento de encapsulação, de liberação prolongada do fármaco e de modo a manter as características fotofísicas e fotossensitizadoras da ftalocianinade, além de propiciar uma forma de veiculação do AIClPc para sua administração sistêmica e mostrar-se eficaz em sua utilização na Terapia Fotodinâmica de tumores profundos e em fase avançada.

Descrição das Figuras

Figura 1: Cinética de liberação da ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc) incorporada em nanocápsula convencional (NC PLA) e nanocápsula furtiva (NC PLA-PEG) na concentração de 0,2mg/mL. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão para n=3.

Figura 2: Espectro de absorção no visível do AlClPc livre e extraído de formulações de nanocápsula convencional (NC PLA) e furtiva (NC PLA-PEG).

Figura 3: Avaliação da citotoxicidade no escuro do AlClPc encapsulado. Fibroblastos foram incubados por 4 horas com as formulações de NC de PLA (PM=42,5kDa), NC de PLA (PM=75kDa), NC de PLA-PEG (PM=66kDa) contendo o equivalente a concentração de 10 μ mol de AlClPc. Os resultados de viabilidade celular são expressos como média + DP (n=3). * Diferença significativa em relação ao controle (p<0,05).

Figura 4: Avaliação da fototoxicidade do AlClPc encapsulado e irradiado com (A) 3J/cm² e (B) 10J/cm² de luz. Fibroblastos foram incubados por 4 horas com NC de PLA (PM=42kDa), NC de PLA (PM=75kDa) e NC de PLA-PEG contendo AlClPc equivalente a concentração de 10 μ mol. Os resultados de viabilidade celular são expressos como média + DP (n=3). **Diferença significativa em relação ao controle (p<0,001).

Figura 5: Peso médio do tumor de animais sacrificados uma, duas e três semanas após a primeira dose de luz do tratamento com solução controle ou com AlClPc livre, solubilizado na mesma solução do controle, e não irradiado com luz visível. Os resultados são expressos como média \pm EP, n=4-5. p>0,05 quando comparados os dois grupos em cada semana.

Figura 6: Peso médio do tumor de animais sacrificados uma, duas ou três semanas após o tratamento com solução controle, AlClPc livre e nanocápsulas de PLA (PM=42kDa) e de PLA-PEG, contendo 0,2mg/mL de AlClPc. Todas as formulações foram administradas i.v. e irradiadas 24, 48 e 72 horas após administração. Os resultados são expressos como média \pm EP, n=5-4. *Diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle.

Figura 7: Variação no volume do tumor (mm³) de animais do grupo controle e do grupo tratado com AlClPc livre não irradiado. As medidas de tamanho dos tumores foram realizadas duas vezes por semana após a Terapia Fotodinâmica. Os dados são expressos como média \pm erro padrão médio de n = 22 (nos dias 0, 1 e 4), n = 17 (nos dias 7 e 11), n = 12 (nos dias 15 e 18) e n = 7 (nos dias 21 e 25).

Figura 8: Variação no volume médio do tumor (mm^3) de animais do grupo controle, do grupo tratado com AlClPc livre e do grupo tratado com AlClPc encapsulado em NC de PLA (PM=42kDa). Todos irradiados 24, 48 e 72h após administração i.v. das formulações. As medidas de tamanho dos tumores foram realizadas duas vezes por semana após a terapia fotodinâmica. Os dados são expressos como média \pm erro padrão médio de n=22 (nos dias 0, 1 e 4), n=17 (nos dias 7 e 11), n=12 (nos dias 15 e 18) e n=7 (nos dias 21 e 25 após Terapia Fotodinâmica). Diferença significativa em relação ao controle *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

Figura 9: Variação no volume médio do tumor (mm^3) de animais do grupo controle, do grupo tratado com AlClPc livre e do grupo tratado com AlClPc encapsulado em NC de PLA-PEG. Todos irradiados 24, 48 e 72h após administração i.v. das formulações. As medidas de tamanho dos tumores foram realizadas duas vezes por semana após a primeira dose de luz. Os dados são expressos como média \pm erro padrão médio de n=22 (nos dias 0, 1 e 4), n=17 (nos dias 7 e 11), n=12 (nos dias 15 e 18) e n=7 (nos dias 21 e 25 após Terapia Fotodinâmica). Diferença significativa em relação ao controle *P<0,05 e **P<0,01

Figura 10: Crosta formada na região do tumor 24h após o fim das seções de irradiação. Animais tratados com 6,0mg/kg (A) e 0,5mg/kg (B) de AlClPc encapsulado em NC de PLA

REIVINDICAÇÕES

1- NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E DE CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA PROLONGADA CONTENDO CLORO-ALUMÍNIO FTALOCIANINA PARA TERAPIA FOTODINÂMICA DO CANCER *caracterizada*

5 *pela* metodologia de preparo de nanocápsulas convencionais e furtivas através de modificação do método de nanoprecipitação por adição de etanol (5 a 75%) à fase orgânica durante o processo de encapsulação com conseqüente alteração das proporções entre fase aquosa e orgânica e tendo como produto nanocápsulas compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica funcionando como carreadores de escolha para o
10 encapsulamento da ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc).

2-Produto do encapsulamento da ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc) em nanocápsulas de ácido poli-D,L-láctico e do polímero dibloco de monometoxipolietilenoglicol (5000)-co-poli-D,L-lactídeo (PLA-PEG) pelo método descrito nesta patente.

15 3- Método de preparo de nanocápsulas convencionais e furtivas de ácido poli-D,L-láctico e do polímero dibloco de monometoxipolietilenoglicol (5000)-co-poli-D,L-lactídeo (PLA-PEG) compostas de um núcleo oleoso líquido constituído de triglicerídeos de cadeia média, caracterizada pela adição de etanol na fase orgânica durante o processo de obtenção das nanocápsulas para encapsulamento do AlClPc.

20 4- Método de preparação de nanocápsulas convencionais e furtivas compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, caracterizada pela adição de etanol à fase orgânica durante o processo de encapsulação de AlClPc, obtendo-se nanocápsulas com alto rendimento de encapsulação (~ 100%) e com alta eficiência do processo (80-87%) em uma só etapa, sem a necessidade de técnicas de purificação posteriores.

25 5- Método de preparação de nanocápsulas convencionais e furtivas compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica para encapsulação de AlClPc, que produzem nanocápsulas por método simples e rápido permitindo a obtenção de partículas de tamanho muito reduzido (100-250nm) e com excelente polidispersão (inferior a 0,15), liberação prolongada da AlClPc, a estabilidade do produto polimérico em meios biológicos
30 e a facilidade de produção na forma estéril e de transposição de escala para produção e posterior comercialização.

6- Nanocápsulas de PLA (convencionais) e PLA-PEG (furtivas) contendo AlClPc com perfil de liberação do AlClPc prolongado por período superior a 7 dias *in vitro*.

5 7- Nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ftalocianina de cloro-alumínio constituídas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, funcionando como carreadores de escolha, de acordo com as reivindicações 1,2,3,4,5 e 6 caracterizada por constituírem de polímeros estáveis, com baixa toxicidade e que consistem de materiais biocompatíveis e biodegradáveis.

10 8- Nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ftalocianina de cloro-alumínio constituídas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, funcionando como carreadores de escolha, de acordo com as reivindicações 1,2,3,4, 5 e 6 caracterizada por constituir-se num mecanismo de transporte de fotossensitizadores, preferencialmente ftalocianina de cloro-alumínio e seus derivados lipofílicos, para regiões tumorais.

15 9- Nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ftalocianina de cloro-alumínio, compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, funcionando como carreadores de escolha, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 caracterizadas pela manutenção das propriedades fotofísicas da ftalocianina de cloro e alumínio após a encapsulação e pela manutenção da ação fototóxica testada in cultura de células.

20 10- Nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ftalocianina de cloro-alumínio, compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, funcionando como carreadores de escolha, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e possibilitando a liberação prolongada da ftalocianina de cloro-alumínio, por período superior a sete dias, podendo este período de liberação ser modulado de acordo com a formulação.

25 11- Nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ftalocianina de cloro-alumínio, compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, funcionando como carreadores de escolha, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 e possibilitando a administração intravenosa da ftalocianina de cloro-alumínio.

30 12- Nanocápsulas convencionais e furtivas compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, funcionando como carreadores de escolha, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 caracterizada por constituir-se num

mecanismo de transporte de fotossensibilizadores, preferencialmente ftalocianina de cloro-alumínio, para aplicação na Terapia Fotodinâmica.

13- Nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ftalocianina de cloro-alumínio, compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, funcionando como
5 carreadores de escolha, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 caracterizada por constituir-se num mecanismo de transporte de fotossensibilizadores, preferencialmente ftalocianina de cloro-alumínio, para aplicação na Terapia Fotodinâmica do câncer.

14- Nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ftalocianina de cloro-alumínio,
10 compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, funcionando como carreadores de escolha, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 caracterizada por obtenção de resposta significativa no tratamento experimental de tumores em fase avançada por Terapia Fotodinâmica.

15- Nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ftalocianina de cloro-alumínio,
15 compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, funcionando como carreadores de escolha, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 caracterizada por obtenção de resposta significativa no tratamento experimental de tumores malignos superficiais e profundos em fase avançada por Terapia Fotodinâmica.

16- Nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ftalocianina de cloro-alumínio,
20 compostas de um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, funcionando como carreadores de escolha, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 caracterizada por obtenção de resposta significativa no tratamento experimental de enfermidades onde a morte celular e necrose/apoptose de tecidos, células, bactérias, vírus ou parasitas sejam necessárias.

25 17-Formulação de solventes solubilizante da ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc) para administração intravenosa composta de dimetilacetamida e polietilenoglicol que pode ser diluída em solução de glicose) sem a presença de precipitações e instabilidades da AlClPc.

30 18-Uso e aplicação da reivindicação 17 para estudos pré-clínicos e clínicos com a AlClPc na terapia fotodinâmica.

19-Formulações farmacêuticas de maior atividade fotodinâmica contendo ftalocianina de cloro-alumínio incorporada à nanocápsulas constituídas de polímeros biodegradáveis.

20-Formulações farmacêuticas que contenham ftalocianina de cloro alumínio
5 incorporadas a nanocápsulas de ácido poli-*D,L*-lático e do polímero dibloco de monometoxipolietilenoglicol (5000)-co-poli-*D,L*-lactídeo (PLA-PEG) constantes nas reivindicações 6 a 16 e produzidas de acordo com as reivindicações 1, 3, 4 e 5.
21-Um método de tratamento de tumores profundos ou superficiais que inclui: utilização de ftalocianina de cloro alumínio incorporada a nanocápsulas de ácido poli-*D,L*-lático ou
10 nanocápsulas do polímero dibloco de monometoxipolietilenoglicol (5000)-co-poli-*D,L*-lactídeo (PLA-PEG), administração endovenosa das mesmas e irradiação da região tumoral com luz no comprimento de onda absorvida pelo composto.

22-Um método *in vitro* ou *in vivo* de fotossensibilização, utilizando ftalocianina de cloro alumínio incorporada a nanocápsulas de ácido poli-*D,L*-lático ou nanocápsulas do
15 polímero dibloco de monometoxipolietilenoglicol (5000)-co-poli-*D,L*-lactídeo (PLA-PEG), capaz de destruir ou prejudicar o funcionamento de tecidos, células, bactérias, vírus ou parasitas após incubação ou administração de uma quantidade eficaz do composto e a irradiação do alvo com luz no comprimento de onda absorvido pela referida ftalocianina.

23-Aplicação do produto, obtido pelo método descrito em 1,3,4 e 5 e caracterizado
20 nas reivindicações 6 a 16, no tratamento de enfermidades cutâneas, como ceratoses actínicas, carcinomas basocelulares e espinocelulares, doença de Bowen, acne, envelhecimento causado pelo sol, enfermidades odontológicas, como no combate às bactérias e inflamações do nervo, doença periodontal, prevenção de cárie, tratamentos da gengiva e canal e em oncologia, como no tratamento de cânceres de boca, laringe, esôfago, estômago, pulmão,
25 bexiga, próstata, cervical, displasia cervical e redução de tumores obstrutivos em pacientes com câncer de esôfago. Aplicação também em demais enfermidades como psoríase, degeneração macular da retina, condições autoimunes, arteriosclerose e restenose, remoção de verrugas, tratamento de micoses fungóides, destruição de infestações bacterianas resistentes a tratamentos tradicionais à base de antibióticos e desativação de vírus como da
30 herpes (Herpes simplex -1, herpes simplex - 2, varicela zoster).

FIGURAS

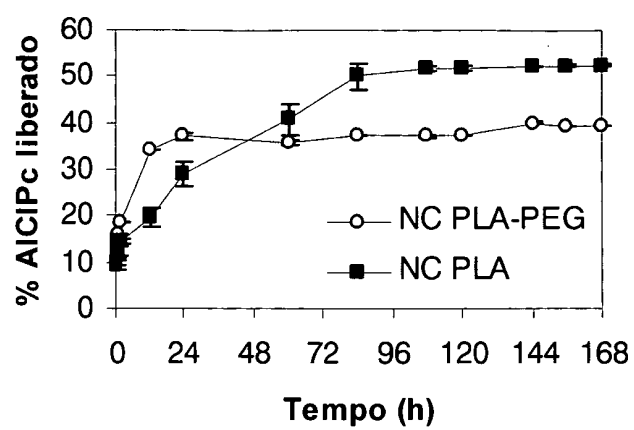


Figura 1

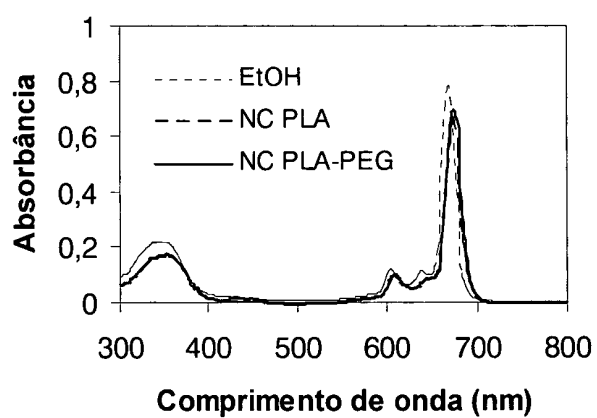


Figura 2

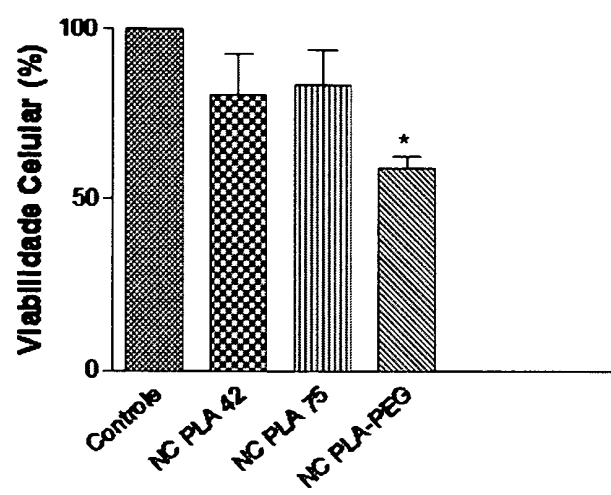
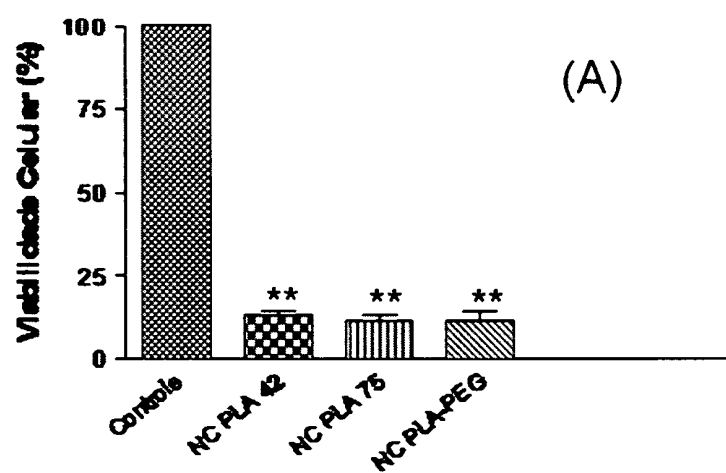


Figura 3



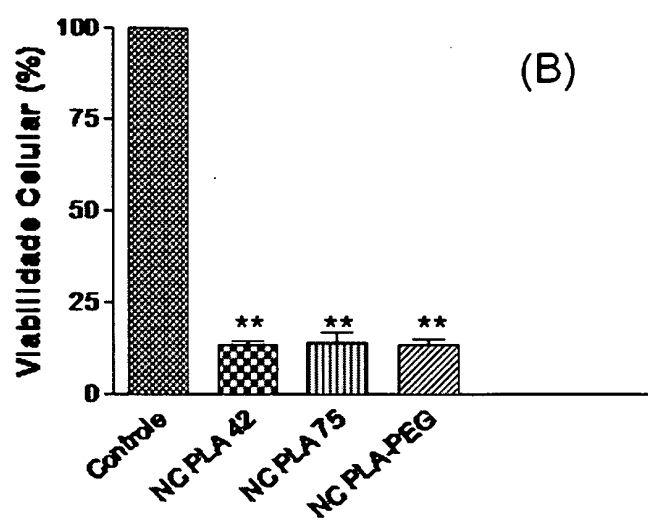


Figura 4

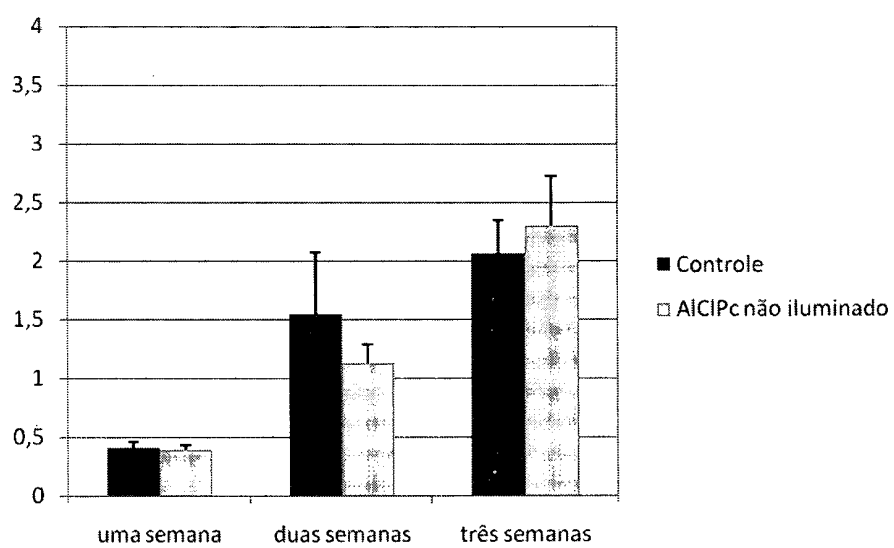


Figura 5

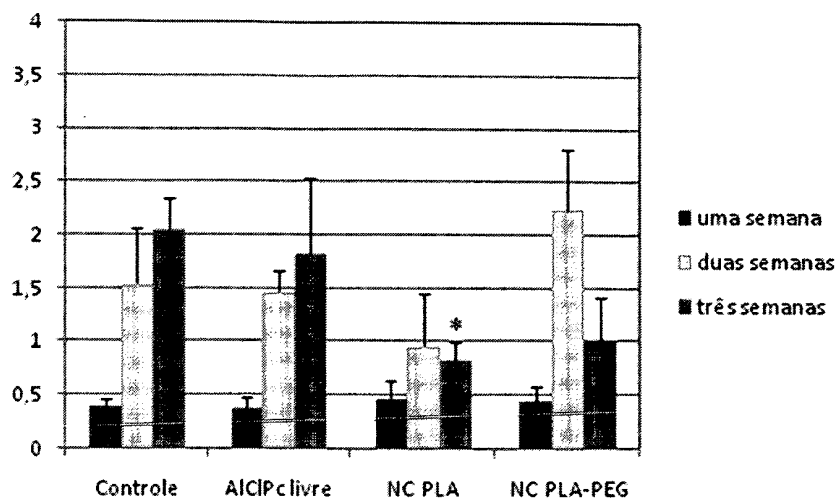


Figura 6

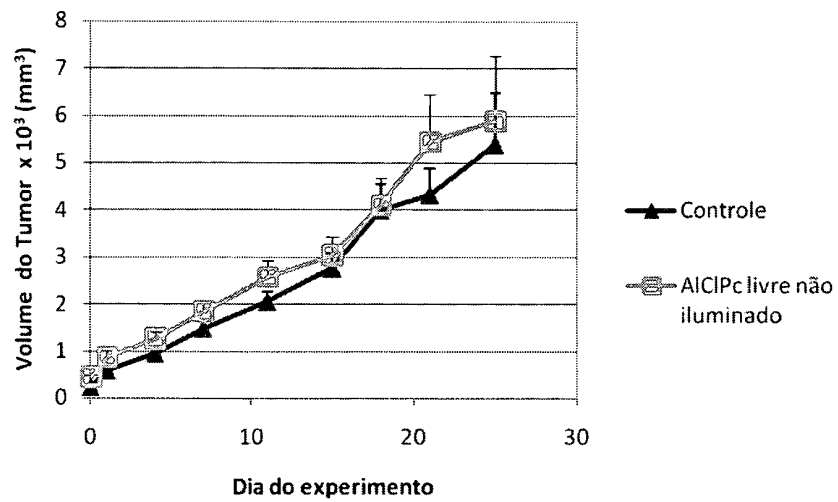


Figura 7

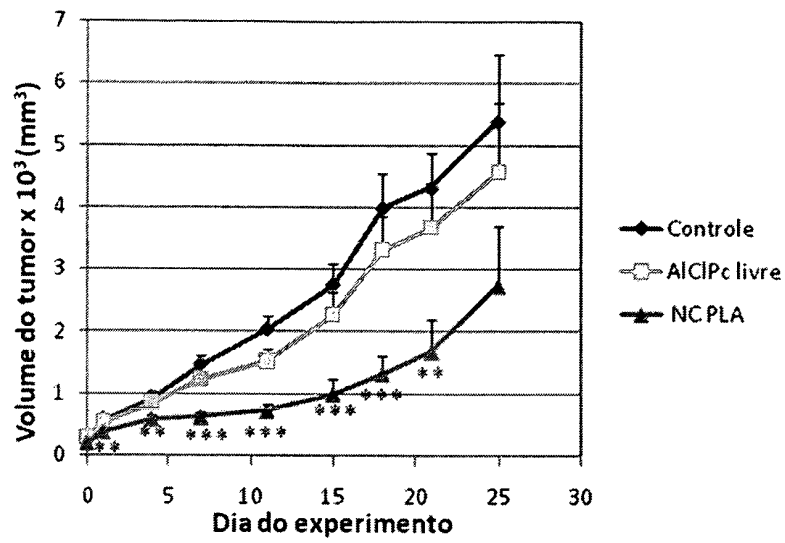


Figura 8:

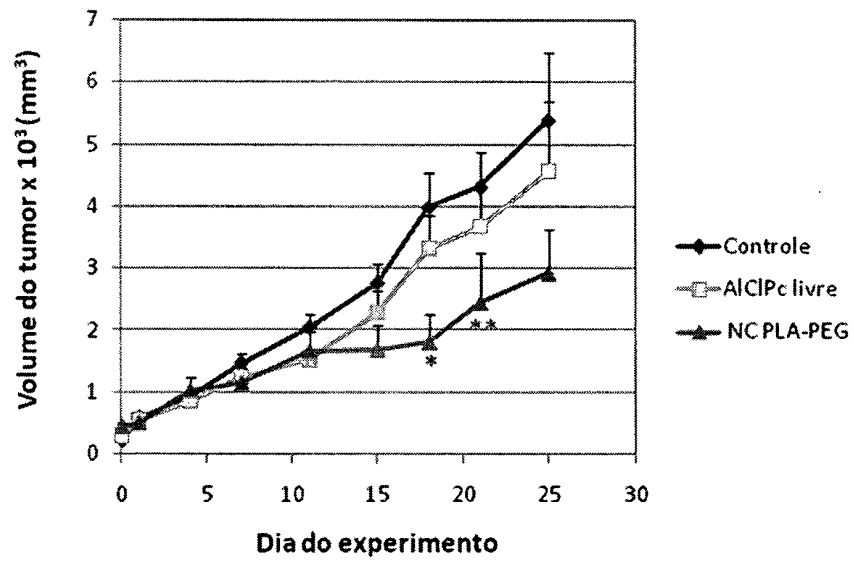
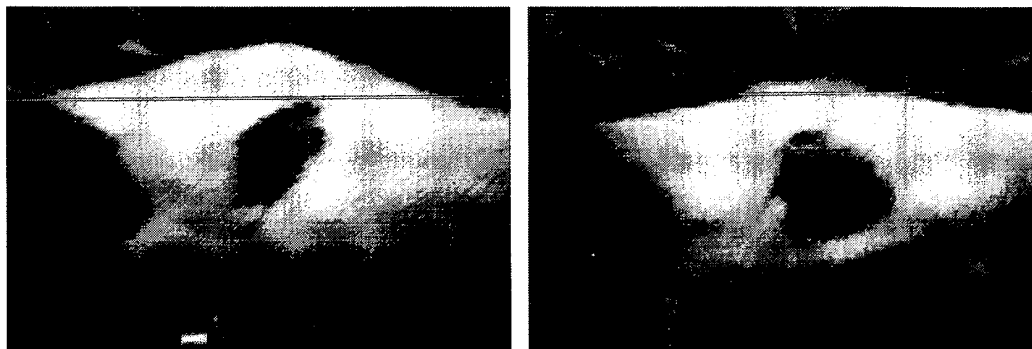


Figura 9

Anexo II

Fotografia: Crosta formada na região do tumor 24h após o fim das seções de irradiação. Animais tratados com 6,0mg/kg (A) e 0,5mg/kg (B) de AlClPc encapsulado em NC de PLA.



PI0905624-0

RESUMO

NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E DE CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA PROLONGADA CONTENDO CLORO-ALUMÍNIO FTALOCIANINA PARA TERAPIA FOTODINÂMICA DO CANCER

- 5 A presente invenção representa uma forma de veiculação, constituída de nanocápsulas, contendo ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc), um agente fotossensibilizador que pode ser utilizado na Terapia Fotodinâmica (TFD) do câncer e de outras doenças. A metodologia de preparo consiste modificação do método de nanoprecipitação por adição de etanol (5 a 75%) à fase orgânica durante o processo de
- 10 encapsulação com conseqüente alteração das proporções entre fase aquosa e orgânica. Trata-se a invenção de obtenção das nanocápsulas convencionais (PLA) e furtivas (PLA-PEG) contendo a ftalocianina de cloro-alumínio como agente fotossensitizador para aplicação na terapia fotodinâmica de tumores profundos e superficiais, pelo método de deposição interfacial de um polímero preformado (nanoprecipitação).