República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

* B R 1 0 2 0 2 1 0 1 4 1 4 8 A 2 *

(21) BR 102021014148-4 A2

(22) Data do Depósito: 19/07/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 31/01/2023

(54) Título: NANOLIPOSSOMA ANIÔNICO UNILAMELAR E PROCESSO DE PRODUÇÃO EM ÚNICA ETAPA DO MESMO

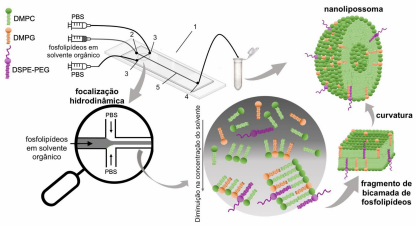
(51) Int. Cl.: B01L 3/00; A61K 47/54; A61K 47/10.

(52) CPC: B01L 3/502784; B01L 2200/0636; A61K 47/544; A61K 47/10.

(71) Depositante(es): CNPEM - CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ENERGIA E MATERIAIS; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE.

(72) Inventor(es): OHANNA MARIA MENEZES MADEIRO DA COSTA; ANTONIO AUGUSTO-MALFATTI GASPERINI; SEVERINO ALVES JÚNIOR.

(57) Resumo: NANOLIPOSSOMA ANIÔNICO UNILAMELAR E PROCESSO DE PRODUÇÃO EM ÚNICA ETAPA DO MESMO. A presente descrição se refere a um nanolipossoma aniônico (AL) e um nanolipossoma aniônico stealth (AL), ambos unilamelares, com dimensões entre 52 e 58 nm e índice de polidispersão entre 0,05 e 0,09. Também é descrito seu processo de produção contínuo, em etapa única, utilizando um dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica (1), que consiste na injeção de uma mistura de fosfolipídios dispersa em solvente orgânico com baixa toxicidade numa entrada de fluido principal (2) do dispositivo microfluídico (1), concomitantemente com a injeção de uma solução salina (PBS) em pelo menos uma entrada de fluido radial (3) do dispositivo microfluídico (1), sendo recolhida uma solução com nanolipossomas aniônicos unilamelares em pelo menos uma saída de fluido (4) do dispositivo microfluídico (1).



NANOLIPOSSOMA ANIÔNICO UNILAMELAR E PROCESSO DE PRODUÇÃO EM ÚNICA ETAPA DO MESMO

CAMPO DA DESCRIÇÃO

[0001] A presente descrição é do campo de preparação de dispersões de lipossomas, com ênfase em processos utilizando dispositivos microfluídicos.

FUNDAMENTOS DA DESCRIÇÃO

[0002] Sistema de entrega de fármacos é uma área promissora da nanomedicina, de caráter multidisciplinar, e que vem revolucionando o sistema convencional de administração de fármacos. A eficiência na atuação desses sistemas depende do sistema utilizado e de suas características.

[0003] Nesse sentido os lipossomas ou vesículas fosfolipídicas que são agregados de fosfolipídios que formam uma bicamada ou mais com interior aquoso são estratégicas, visto que podem atuar como carreadores de substâncias ativas no organismo, e favorecer melhor biodistribuição de medicamentos e aumentar os resultados terapêuticos associados.

[0004] Dentre os tipos de lipossomas, os lipossomas aniônicos (AL) foram examinados como alternativas aos lipossomas catiônicos em aplicações na nanomedicina, por exemplo, em sistemas de entregas de DNA de plasmídeo, devido à sua baixa toxicidade. Em particular, destacamos as formulações lipossomais aniônicas compostas por dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG) que foram lançadas para desenvolvimento clínico, evidenciando o grande potencial dos AL com essa formulação para atuar como nanocarreadores de fármacos para aplicações em liberação de fármacos.

[0005] Entretanto, apesar do grande potencial de aplicação dessas nanoestruturas na nanomedicina alguns desafios subsistem: a alta taxa de eliminação dos lipossomas pelo sistema imune e processo de produção laborioso.

[0006] A utilização de lipídios quimicamente modificados contendo uma cadeia de polímero como polietilenoglicol (PEG), tem sido amplamente estudada, porquanto, viabiliza uma camada protetora na superfície da lamela os

tornando furtivo (*stealth*) com intuito de estender a permanência dos lipossomas aniônicos no sistema circulatório.

[0007] Sobre os processos laboriosos de produção, a microfluídica, que é a ciência do escoamento de fluidos em canais de escala micrométrica, vem sendo frequentemente aplicada na produção de nanoagregados, como os lipossomas.

[0008] Os métodos de produção já descritos na literatura para os lipossomas aniônicos com a formulação DMPC:DMPG:DSPE-PEG são relativamente complexos, pouco reprodutíveis, utilizam solventes orgânicos tóxicos e necessitam de etapas de pós-processamento. Ainda, esses métodos não garantem a homogeneidade dos sistemas e produzem nanoagregados com mais de 100 nm. O tamanho dos sistemas e a homogeneidade são parâmetros fundamentais para o controle da dose do fármaco, permanência no organismo e absorção celular. É conhecido que lipossomas menores e menor polidispersidade são estratégicos no ganho de biodisponibilidade.

[0009] Nesse sentido, estudos voltados para o melhoramento das propriedades dos nanolipossomas e seus métodos de produção são necessários e pertinentes, visto que essa formulação chama bastante atenção pelas vantagens no encapsulamento de fármacos constituídos por pequenas moléculas com baixa solubilidade em água.

ESTADO DA TÉCNICA

[0010] O estado da técnica compreende alguns métodos de produção de lipossomas com aplicações biológicas.

[0011] O documento de patente CN112108193A revela o método de produção de lipossomas através de um sistema microfluídico SHM (acrônimo inglês para Staggered Herringbone Micromixer) ou Tesla. A seguinte produção é caracterizada pela inserção de moléculas de colesterol na formulação lipídica, assim como, utilização de solventes orgânicos, sendo alguns solventes tóxicos, como o metanol e isopropanol. As amostras de lipossomas obtidos apresentaram

dimensões principais entre 110 nm e 600 nm e PDI (acrônimo inglês para Polydispersity Index) próximo de 0,4.

[0012] No documento de patente BRPI0720733 consta a preparação de lipossomas de tamanhos entre 30 e 80 nm, compreendendo, ou não, moléculas de colesterol inseridas na membrana, a fim de regular a sua fluidez. Ainda, foram utilizados álcool t-butílico ou ciclo-hexano na preparação da fase orgânica, que são solventes orgânicos de alta toxicidade, produzindo sistemas multilamelares heterogêneos. O método de obtenção dos lipossomas consiste na hidratação do filme seco, o que não garante a homogeneidade e reprodutibilidade dos sistemas, além disso, foram necessárias múltiplas etapas de pós processamento.

[0013] O documento CA2928387 expõe a obtenção de lipossomas contendo sais de amônio e poliânions no seu interior por seus métodos clássicos de produção, os quais utilizam solventes tóxicos, que são realizados em diversas etapas e não conferem a homogeneidade do sistema.

[0014] Forbes e colaboradores (2019, *International journal of pharmaceutics*, 556, 68-81), tal qual, Khadke e colaboradores (2019, *Journal of Controlled Release*, 307, 211-220) revelam a obtenção de lipossomas multilamelares por mecanismos já descritos na literatura, demonstrando processo laborioso com diversas etapas de pós processamento e utilização de solventes com alta toxicidade.

[0015] É descrito no documento de patente BR 102017025862-9 a produção de lipossomas *stealth* catiônicos, obtidos através do processo microfluídico de focalização hidrodinâmica, possuindo composição lipídica de EPC:DOPE:DOTAP:DSPE-PEG. As amostras apresentaram diâmetro médio de 112,32 nm e PDI 0,14, tendo aplicação preferencial em terapia gênica, no processo de transfecção, que é facilitado pelo caráter catiônico dos lipossomas de interesse.

[0016] Nas anterioridades apresentadas são propostos métodos de obtenção de lipossomas aniônicos utilizando solventes com alta toxicidade,

produzindo lipossomas multilamelares, dependendo de pós processamento e múltiplas etapas de produção.

[0017] Portanto, não é revelado no estado da técnica a produção em etapa única de lipossomas aniônicos (do acrônimo inglês AL) e lipossomas aniônicos *stealth* (do acrônimo inglês SAL) unilamelares, uniformes, com elevada estabilidade coloidal e térmica, sendo de dimensões pequenas (e.g., inferior a 53,7 nm), com PDI inferior a 0,1, utilizando uma composição lipídica comercial (e.g., DMPC:DMPG) e um solvente de baixa toxicidade.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0018] É um dos objetivos da presente descrição revelar um processo de produção contínuo de AL e SAL unilamelares, em etapa única, resultando em nanolipossomas com elevada estabilidade coloidal e térmica, de dimensões inferiores a 58 nm e PDI inferior a 0,1, utilizando como insumos uma composição lipídica comercial e um solvente orgânico de baixa toxicidade.

[0019] Os objetivos da presente descrição são alcançados por um processo de produção de lipossomas aniônicos (AL) unilamelares, conduzido em um dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica. Tais dispositivos encontram-se prontamente disponíveis no estado da técnica, compreendendo pelo menos duas entradas de fluido e pelo menos uma saída de fluido, com canais tendo dimensões internas entre 135 e 145 µm, preferencialmente 140 µm. O processo compreende as etapas de:

[0020] injetar em pelo menos uma entrada de fluido principal do dispositivo microfluídico uma mistura de fosfolipídios dispersos em solvente orgânico compreendendo pelo menos os fosfolipídios dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidil glicerol (DMPG) em proporções entre 95:5 e 85:15 %molar de DMPC:DMPG, preferencialmente em proporções de 90:10 %molar, a mistura de fosfolipídios tendo concentrações entre 20 e 30 mM em solvente orgânico, preferencialmente tendo concentração de 25 mM em solvente orgânico; e, simultaneamente,

[0021] injetar uma solução tampão em pelo menos uma entrada de fluido

radial do dispositivo microfluídico, em que a taxa entre a velocidade de escoamento da solução tampão e a velocidade de escoamento da mistura de fosfolipídios é de 5 a 40, preferencialmente 10; e,

[0022] recolher uma solução com lipossomas aniônicos (AL) unilamelares em pelo menos uma saída de fluido do dispositivo microfluídico.

[0023] Os objetivos da presente descrição também são alcançados por um processo de produção de lipossomas aniônicos *stealth* (SAL) unilamelares, conduzido nos mesmos dispositivos e condições do processo de produção de lipossomas aniônicos (AL) unilamelares, diferindo apenas pelo fato da mistura de fosfolipídios injetada compreender ainda o estabilizador estérico 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000 (mDSPE-PEG_{2000}) em proporções entre 94,5:5:0,5 e 85:13:2 %molar de DMPC:DMPG:mDSPE-PEG_{2000}, preferencialmente em proporções de 89:10:1 %molar, a mistura de fosfolipídios tendo concentrações entre 20 e 30 mM em solvente orgânico, preferencialmente tendo concentração de 25 mM em solvente orgânico.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0024] A presente invenção encontra-se ilustrada nas modalidades representadas em figuras, conforme brevemente descritas a seguir.

[0025] A figura 1 é uma representação esquemática de uma modalidade do processo de produção e dos nanolipossomas aniônicos *stealth* unilamelares da presente descrição.

[0026] As figuras 2a, 2b e 2c são gráficos resultantes de ensaios de caracterização dos nanolipossomas aniônicos (AL) unilamelares obtidos pelo presente método, sendo, respectivamente, caracterização de distribuição de tamanho por espalhamento dinâmico de luz (da sigla inglesa, DLS), caracterização de potencial zeta por anemometria de laser-doppler (com acrônimo inglês LDA), em diversos tempos, e caracterização por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (conhecido pelo acrônimo SAXS, do inglês), em diversas temperaturas.

[0027] As figuras 3a, 3b e 3c são gráficos resultantes de ensaios de caracterização dos nanolipossomas aniônicos *stealth* (SAL) unilamelares obtidos pelo presente método, sendo, respectivamente, caracterização de distribuição de tamanho por espalhamento dinâmico de luz (DLS), caracterização de potencial zeta por anemometria de laser-doppler (LDA), em diversos tempos, e caracterização por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), em diversas temperaturas.

[0028] A figura 3d é uma imagem de criomicroscopia eletrônica de transmissão dos nanolipossomas aniônicos *stealth* obtidos pelo presente método.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0029] A presente descrição se refere a um nanolipossoma aniônico (AL) e um nanolipossoma aniônico *stealth* (SAL), ambos unilamelares, com dimensões entre 52 e 55 nm e índice de polidispersão entre 0,09 e 0,07. Também é descrito seu processo de produção contínuo, em etapa única, utilizando um dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica.

[0030] A figura 1 é uma representação esquemática de uma modalidade do processo de produção e dos nanolipossomas aniônicos unilamelares da presente descrição. São representados nesta figura os principais elementos de uma modalidade do dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica (1), com detalhe para o encontro das correntes de fluxos (5) internos. Também é representado o mecanismo de formação dos nanolipossomas unilamelares, favorecido pela diminuição da concentração de solvente orgânico após a focalização hidrodinâmica.

[0031] Em uma modalidade do processo de produção de nanolipossomas aniônicos unilamelares, o dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica (1) compreende: pelo menos duas entradas de fluido (2,3); e pelo menos uma saída de fluido (4), em que as entradas de fluido (2,3) são conectadas fluidamente por microcanais (5) que se unem em um microcanal (5) conectado fluidamente a saída de fluido (4), os microcanais (5) tendo dimensões internas

entre 135 e 145 µm, preferencialmente 140 µm.

[0032] Em uma modalidade deste processo, o dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica possui uma única entrada de fluido principal (2) e duas entradas de fluido radiais (3), em que as entradas de fluido radiais (3) são perpendiculares à entrada de fluido principal (2). Essa modalidade resulta em um dispositivo microfluídico (1) com microcanais (5) em formato de "T", conforme representado na figura 1.

[0033] Em outras modalidades, o dispositivo microfluídico de focalização possui uma pluralidade de entradas de fluido radiais, sendo perpendiculares ou não a entrada de fluido principal, em que essas modalidades de dispositivo se encontram prontamente disponíveis no estado da técnica, conforme revisão apresentada por Lu e colaboradores, 2016 (*Nano Today*, 11(6): 778–792). Em outras modalidades, o dispositivo microfluídico de focalização possui uma pluralidade de entradas de fluido radiais, sendo coaxiais a entrada de fluido principal.

[0034] Em quaisquer modalidades deste processo, a produção de nanolipossomas aniônicos unilamelares é realizada de forma contínua, em etapa única, que consiste na injeção de uma mistura de fosfolipídios dispersa em solvente orgânico na entrada de fluido principal (2) do dispositivo microfluídico (1), concomitantemente com a injeção de uma solução salina em pelo menos uma entrada de fluido radial (3) do dispositivo microfluídico (1), sendo recolhida uma solução com nanolipossomas aniônicos unilamelares em pelo menos uma saída de fluido (4) do dispositivo microfluídico (1).

[0035] Em uma modalidade, a mistura de fosfolipídios dispersa em solvente orgânico compreende pelo menos os fosfolipídios DMPC e DMPG em proporções entre 95:5 e 85:15 %molar de DMPC:DMPG, preferencialmente em proporções de 90:10 %molar. A mistura de fosfolipídios é provida em concentrações entre 20 e 30 mM em solvente orgânico, preferencialmente tendo concentração de 25 mM em solvente orgânico.

[0036] Em uma modalidade, a mistura de fosfolipídios compreende ainda

o estabilizador estérico mDSPE-PEG_{2000} em proporções entre 94,5:5:0,5 e 85:13:2 %molar de DMPC:DMPG:mDSPE-PEG_{2000}, preferencialmente em proporções de 89:10:1 %molar, a mistura de fosfolipídios tendo concentrações entre 20 e 30 mM em solvente orgânico, preferencialmente tendo concentração de 25 mM em solvente orgânico.

[0037] Em uma modalidade, a taxa entre a velocidade de escoamento da solução salina e a velocidade de escoamento da mistura de fosfolipídios é de 5 a 40, preferencialmente 10. Uma vez que o tamanho do canal dificulta a formação de escoamento turbulento, a difusão passa a ser o único mecanismo de transferência de massa envolvido no fenômeno. Por isso, a taxa entre a velocidade da solução salina e da mistura de fosfolipídios torna-se um parâmetro muito importante para a formação dos nanolipossomas, pois aumenta o mecanismo de interdifusão entre os fluidos pela compressão do veio fluido de fosfolipídios, diminuindo o conteúdo do solvente orgânico, e, assim, reduzindo o tempo de mistura e produção dos produtos. Ademais, essa compressão também atua na qualidade, tamanho médio e distribuição de tamanhos das estruturas formadas. Outrossim, o aumento indiscriminado das velocidades de escoamento pode causar deformações na parede dos microcanais, promovendo não-uniformidades na formação dos lipossomos. Portanto, o controle das faixas de velocidade dos escoamentos é essencial para alcançar as vantagens reveladas no presente processo.

[0038] Em uma modalidade, o solvente orgânico é etanol anidro. Em outras modalidades, o solvente orgânico é selecionado do grupo que compreende metanol anidro e isopropanol anidro.

[0039] Em uma modalidade, a solução salina é PBS. Em outras modalidades, a solução salina é uma solução selecionada do grupo que compreende as soluções de LiCl, NaCl, KCl, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $AlCl_3$ e $ZnCl_2$.

EXEMPLOS DE CONCRETIZAÇÃO DA INVENÇÃO

[0040] No que segue, são apresentadas realizações exemplares do objeto

aqui descrito, de modo não restritivo, ilustrando resultados e vantagens alcançadas pelo mesmo.

[0041] As figuras 2a, 2b e 2c são gráficos resultantes de ensaios de caracterização dos nanolipossomas aniônicos (AL) unilamelares obtidos pelo presente método, utilizando como insumo a mistura de fosfolipídios DMPC:DMPG em proporções de 90:10 %molar em etanol 25 mM, usando solução tampão nas entradas radiais, com taxa entre as velocidades dos escoamentos de 10, e o dispositivo microfluídico com microcanais em formato de "T".

[0042] A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi usada para medir a distribuição de tamanho, a polidispersidade e o diâmetro hidrodinâmico médio dos lipossomas. Para tanto, utilizou-se um equipamento Zetasizer Nano ZS (da empresa Malvern Panalytical, Reino Unido) com ângulo de detecção de retroespalhamento de 173°, laser He/Ne que emite a 633 nm e fonte de alimentação de 4,0 mW. O diâmetro hidrodinâmico médio - ou média Z - foi ponderado pela intensidade de espalhamento DLS. O tamanho médio das partículas foi obtido a partir dos resultados de três medições. A distribuição do tamanho foi avaliada pelo índice de polidispersidade (PDI). Esse índice é calculado a partir da análise cumulativa da função de autocorrelação de intensidade DLS. O índice varia de 0 a 1; valores mais baixos indicam uma distribuição mais homogênea para tamanhos de partículas. Todas as amostras foram diluídas para 0,3 mM antes da análise.

[0043] O potencial zeta foi obtido medindo-se a mobilidade eletroforética das partículas pela técnica de anemometria laser-doppler (DLS). As medições para cada amostra foram realizadas em triplicata a 25 °C usando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Reino Unido).

[0044] Os experimentos espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foram realizados na linha de luz SAXS1 do Laboratório Brasileiro de Luz Síncrotron (LNLS/CNPEM, Brasil) usando uma energia de feixe de 8,3 keV (λ = 1,47 Å) e distância amostra-detector de 880 mm. A intensidade medida é exibida

como uma função do módulo de transferência de momento espacial recíproco $q = 4\pi \sin(\theta) / \lambda$, onde 2θ é o ângulo de espalhamento e λ é o comprimento de onda da radiação. A faixa típica de valores de q foi de 0,015 $Å^{-1}$ a 0,50 $Å^{-1}$, e os experimentos foram feitos na faixa de temperatura de 15 a 40 °C.

[0045] A análise dos resultados foi baseada no modelo de lipídio bicamada. A intensidade de espalhamento pode ser escrita como uma função do módulo de vetor de espalhamento $I(q)$ da seguinte forma:

$$I(q) = \frac{S(q) \ |F(q)^2|}{q^2}$$

[0046] em que $F(q)$ é o fator de forma, que descreve a forma como cada bicamada espalha os raios-X; e $S(q)$ é fator de estrutura, que está relacionado à organização de empilhamento das bicamadas no sistema. Para modelagem de $F(Q)$, usamos o modelo de deconvolução gaussiana, para simular o perfil de densidade eletrônica (EDP) através da bicamada lipídica. Para o fator de estrutura, foi utilizado um modelo baseado na Teoria de Caillé Modificada (MCT), que permite uma descrição adequada do fator de estrutura para sistemas lamelares.

[0047] Na figura 2a é possível observar, através dos resultados do DLS para 7 dias, uma alta estabilidade dos lipossomas, que apresentaram perfil monomodal, com baixa polidispersão (0,080 ± 0,009), e com tamanho médio de em torno de 53,7 ± 1,4 nm. Estudos anteriores relataram a produção dessas estruturas aniônicas com a mesma composição por métodos convencionais utilizando solventes orgânicos tóxicos, como o terc-butanol, exigindo etapas trabalhosas para a obtenção de estruturas monodispersas e com tamanho superior a 100 nm. Além disso, são bem conhecidas as vantagens apresentadas por lipossomas de dimensões menores, que têm taxas de depuração sanguínea mais lentas e, portanto, biodisponibilidade melhorada.

[0048] Com vistas ao gráfico do potencial Zeta, apresentado na figura 2b, obtido por LDA, a estabilidade dos lipossomas é reforçada pelos valores

negativos constantes ao longo do período em que foi monitorado, ao contrário do comportamento das nanoestruturas formadas por espécies isoelétricas. Devido aos lipídios carregados (DMPG) em sua formulação, os grupos principais adquirem uma orientação preferencial na membrana. Os valores do potencial Zeta obtidos estão, neste caso, diretamente associados a espécies carregadas na estrutura lipossomal.

[0049] O tamanho e a distribuição do tamanho dos lipossomas são parâmetros cruciais para garantir a aplicação eficiente dessas estruturas como nanocarreadores, e diretamente ligada a esses parâmetros está a lamelaridade, uma vez que sistemas compostos por estruturas unilamelares podem garantir uma dosagem mais controlada do fármaco. Os dados do gráfico da figura 3c, obtido por SAXS, permitiram determinar a forma e organização das membranas lipídicas. Ajustando as curvas com modelagem adequada, conhecida do estado da técnica, foi possível confirmar que os lipossomas possuem organização unilamelar (fração unilamelar maior que 97%) e, com o aumento da temperatura, foi possível observar seu efeito na fluidez das bicamadas, evidenciado pelo perfil de densidade eletrônica obtido a partir dos ajustes.

[0050] As figuras 3a, 3b e 3c são gráficos resultantes de ensaios de caracterização dos lipossomas aniônicos *stealth* (SAL) unilamelares obtidos pelo presente método, utilizando como insumo a mistura de fosfolipídios DMPC:DMPG:DSPE-PEG_{2000} em proporções de 89:10:1 %molar em etanol 25 nM, usando solução tampão nas entradas radiais, com taxa entre as velocidades dos escoamentos de 10, e o dispositivo microfluídico com microcanais em formato de "T".

[0051] A Figura 3 (a) mostra que a inserção do estabilizador estérico DSPE-PEG_{2000} na composição da formulação alterou ligeiramente o tamanho dos lipossomas, manteve o perfil monomodal e permaneceu estável durante o tempo de monitoramento. O diâmetro hidrodinâmico foi em torno de 56,9 ± 0,4 nm e índice de polidispersão de 0,060 ± 0,004. Em comparação, a literatura relata a produção desta plataforma utilizando solvente orgânico tóxico

(clorofórmio e álcool isopropílico) pelo método convencional, necessitando da etapa de ultrassonicação para otimizar o tamanho dos lipossomas, que diminui de 242 nm para 87 nm, com um alto índice de polidispersidade (= 0,309). Conforme relatado na literatura, a plataforma de tamanho 242 nm exibiu uma taxa de liberação mais lenta (24,2%) do que a plataforma otimizada (81,6%) nas primeiras 12 horas de diálise, sugerindo uma circulação sanguínea mais longa para a plataforma não otimizada, demonstrando a importância da obtenção de lipossomas menores para atingir sua eficiência máxima, quando aplicados como nanocarreadores.

[0052] A figura 3b mostra o potencial zeta, que se manteve estável ao longo de 7 dias, em torno de -14,3 mV, compatível com a composição do lipossoma e semelhante ao relatado na literatura de -10 a -13,4 mV, diminuindo a possibilidade de agregação destes sistemas.

[0053] Na figura 3c, são apresentados resultados dos perfis de intensidade SAXS e da imagem crio-TEM [21], que são complementares e corroboram com o fato de que são obtidos nanolipossomas aniônicos *stealth* com organização unilamelar através do processo aqui descrito. Com o aumento da temperatura, as estruturas permaneceram com a mesma conformação e organização.

[0054] A figura 3d é uma imagem de criomicroscopia eletrônica de transmissão dos lipossomas aniônicos stealth obtidos pelo presente método. A imagem corrobora os resultados de SAXS, evidenciando a formação de nanolipossomos com organização unilamelar. As estruturas têm circunferência perfeita (destacadas com setas brancas) e tamanho em torno de 58 nm, conforme já apontado pela análise de DLS.

[0055] Embora modalidades exemplares dos processos e produtos descritos tenham sido apresentadas neste relatório, não se pretende que o escopo de proteção seja limitado à literalidade das mesmas. Portanto, a descrição deve ser interpretada não como limitativa, mas meramente como exemplificações de modalidades particulares que guardam o conceito inventivo

aqui apresentado. Um técnico no assunto poderá prontamente aplicar ensinamentos aqui apresentados em soluções análogas, decorrentes dos mesmos, limitadas apenas pelo escopo das reivindicações deste pedido.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de nanolipossomas aniônicos unilamelares, conduzido em um dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica (1) compreendendo: pelo menos duas entradas de fluido (2,3); e pelo menos uma saída de fluido (4), em que as entradas de fluido (2,3) são conectadas fluidamente por microcanais (5) que se unem em um microcanal (5) conectado fluidamente a saída de fluido (4), os microcanais (5) tendo dimensões internas entre 135 e 145 µm, o processo caracterizado por:

injetar em pelo menos uma entrada de fluido principal (2) do dispositivo microfluídico (1) uma mistura de fosfolipídios dispersa em solvente orgânico compreendendo pelo menos os fosfolipídios DMPC e DMPG em proporções entre 95:5 e 85:15 %molar de DMPC:DMPG, preferencialmente em proporções de 90:10 %molar, a mistura de fosfolipídios tendo concentrações entre 20 e 30 mM em solvente orgânico, preferencialmente tendo concentração de 25 mM em solvente orgânico; e, simultaneamente,

injetar uma solução salina em pelo menos uma entrada de fluido radial (3) do dispositivo microfluídico (1), em que a taxa entre a velocidade de escoamento da solução salina e a velocidade de escoamento da mistura de fosfolipídios é de 5 a 40, preferencialmente 10; e,

recolher uma solução com lipossomas aniônicos unilamelares em pelo menos uma saída de fluido (4) do dispositivo microfluídico (5).

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da mistura de fosfolipídios compreender ainda o estabilizador estérico mDSPE-PEG_{2000} em proporções entre 94,5:5:0,5 e 85:13:2 %molar de DMPC:DMPG:mDSPE-PEG_{2000}, preferencialmente em proporções de 89:10:1 %molar, a mistura de fosfolipídios tendo concentrações entre 20 e 30 mM em solvente orgânico, preferencialmente tendo concentração de 25 mM em solvente orgânico.

3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que o solvente orgânico é etanol anidro.

4 Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que o solvente orgânico é selecionado do grupo que compreende metanol anidro e isopropanol anidro.

5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a solução salina é PBS.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a solução salina é uma solução selecionada do grupo que compreende soluções de LiCl, NaCl, KCl, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $AlCl_3$ e $ZnCl_2$.

7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o dispositivo microfluídico (1) de focalização hidrodinâmica possui uma entrada de fluido principal (2) e duas entradas de fluido radiais (3), em que as entradas de fluido radiais (3) são perpendiculares à entrada de fluido principal (1).

8. Lipossoma aniônico unilamelar caracterizado por ser obtido pelo processo de produção das reivindicações 1 a 7.

9. Lipossoma, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por ter dimensões entre 52 e 58 nm.

10. Lipossoma, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 9, caracterizado por ter índice de polidispersão entre 0,05 e 0,09.

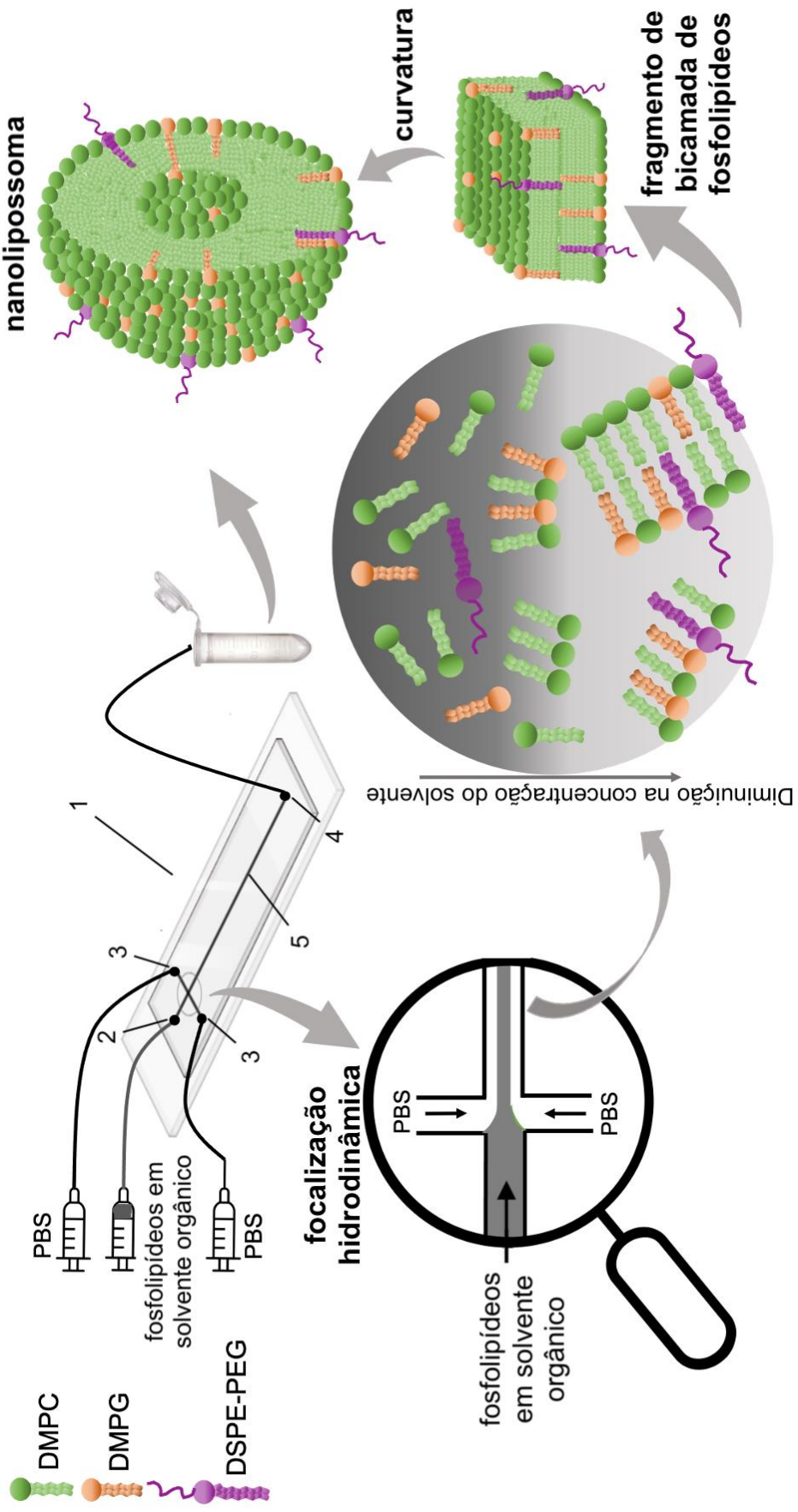

nanolipossoma
curvatura
fragmento de bicamada de fosfolipídeos
Diminuição na concentração do solvente
focalização hidrodinâmica
PBS
PBS
fosfolipídeos em solvente orgânico
fosfolipídeos em solvente orgânico
PBS
PBS
1
2
3
3
4
5
DMPC
DMPG
DSPE-PEG

Fig. 1

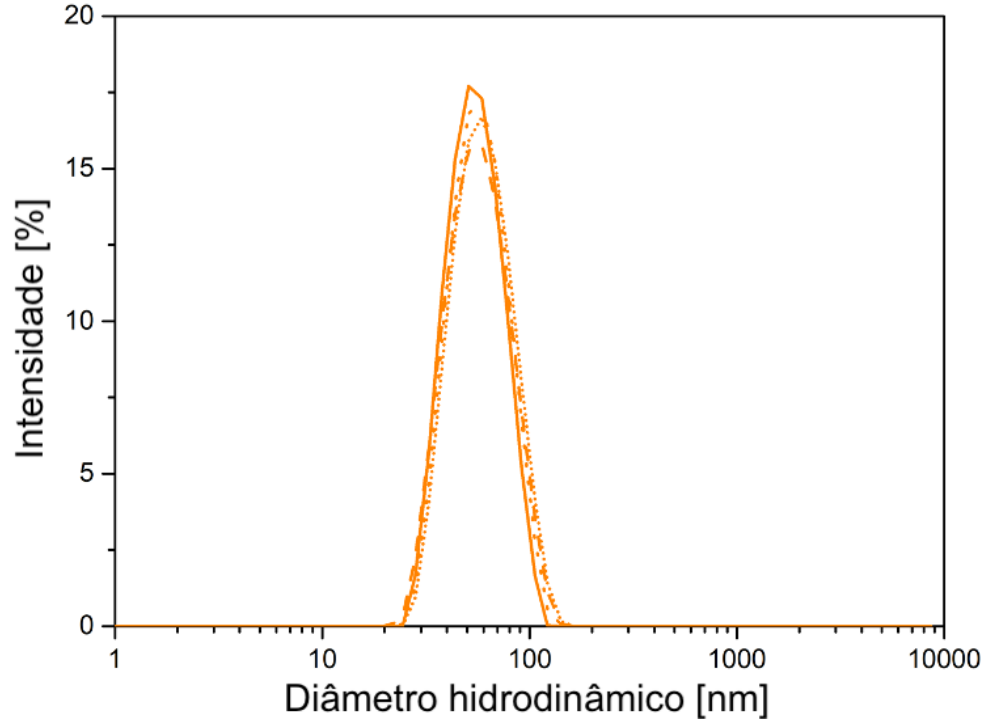

Intensidade [%]
20
15
10
5
0
1
10
100
1000
10000
Diâmetro hidrodinâmico [nm]

Fig. 2a

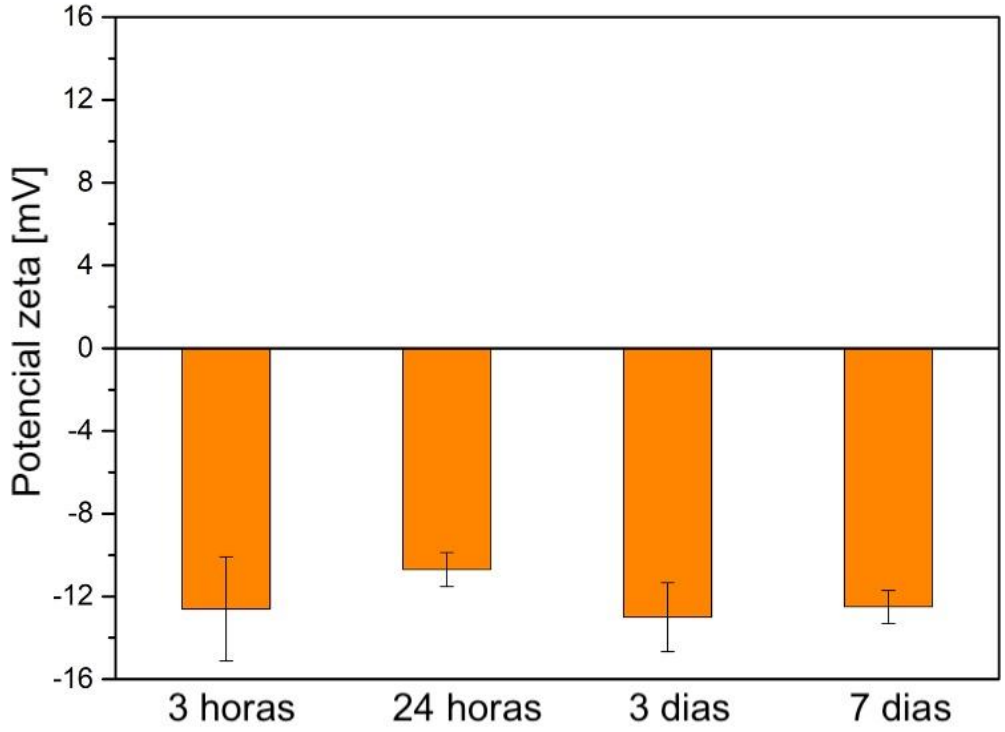

Potencial zeta [mV]
16
12
8
4
0
-4
-8
-12
-16
3 horas
24 horas
3 dias
7 dias

Fig. 2b

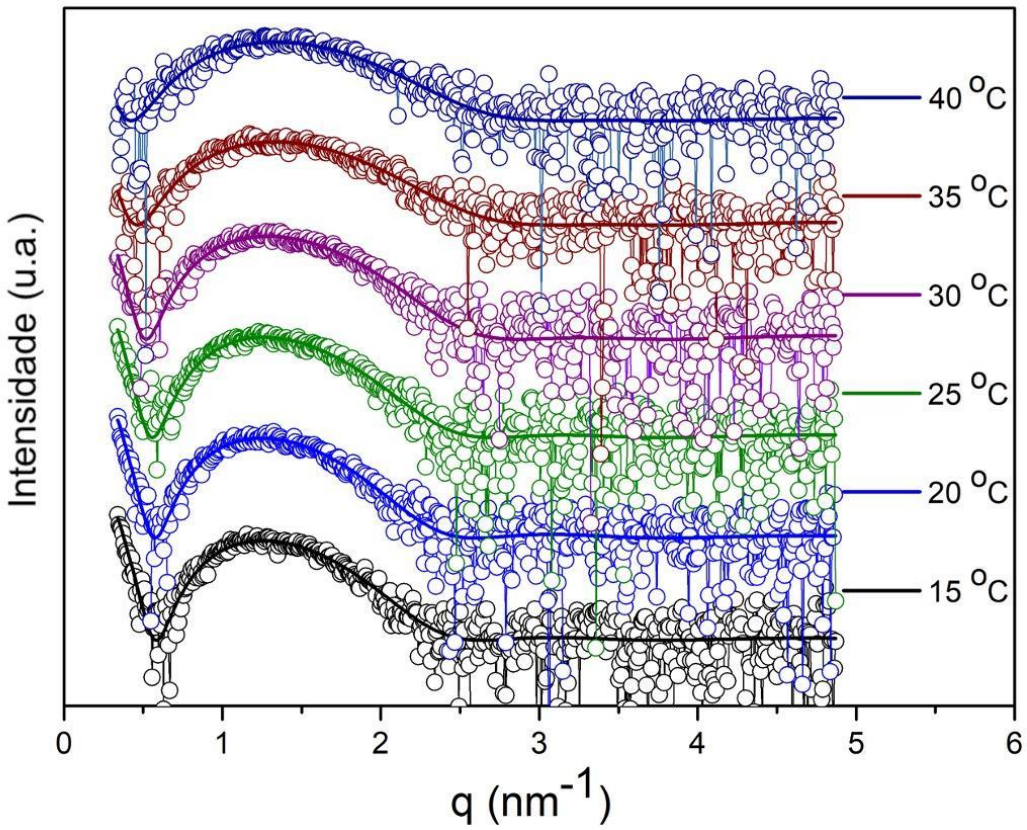

Intensidade (u.a.)
q (nm^{-1})
40 °C
35 °C
30 °C
25 °C
20 °C
15 °C
0
1
2
3
4
5
6

Fig. 2c

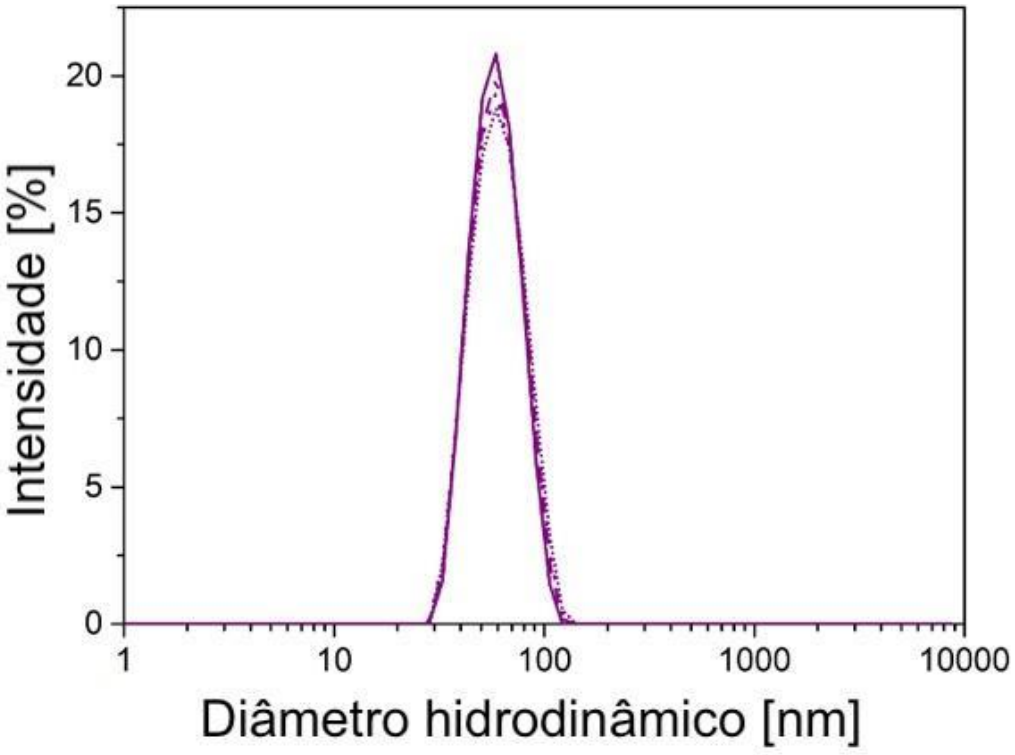

Intensidade [%]
Diâmetro hidrodinâmico [nm]
0
5
10
15
20
1
10
100
1000
10000

Fig. 3a

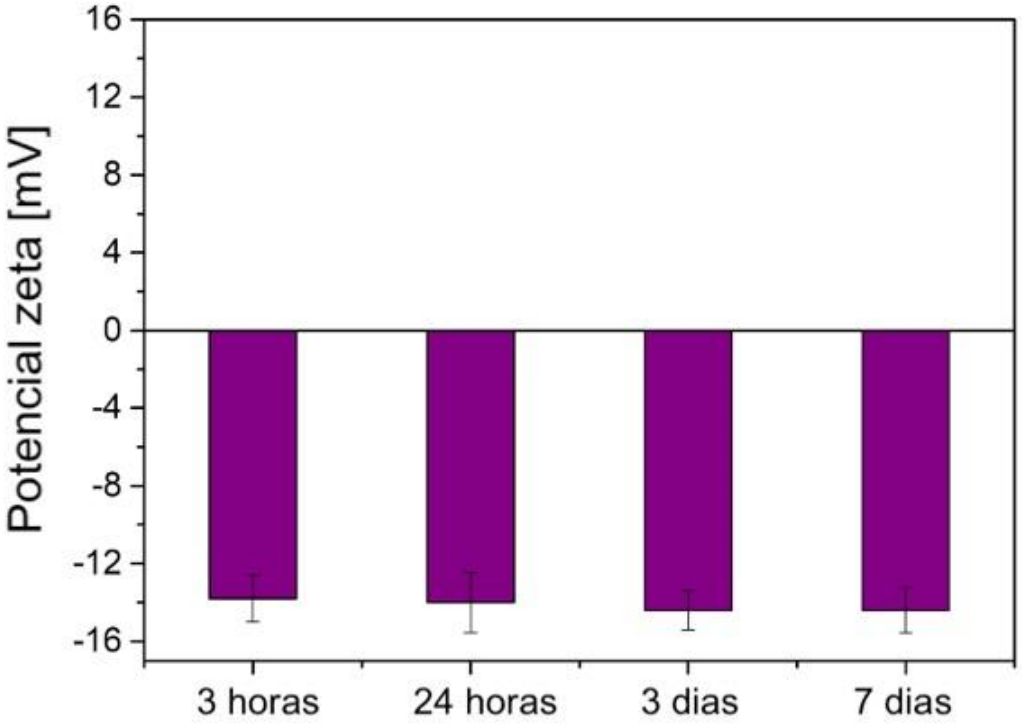

Potencial zeta [mV]
16
12
8
4
0
-4
-8
-12
-16
3 horas
24 horas
3 dias
7 dias

Fig. 3b

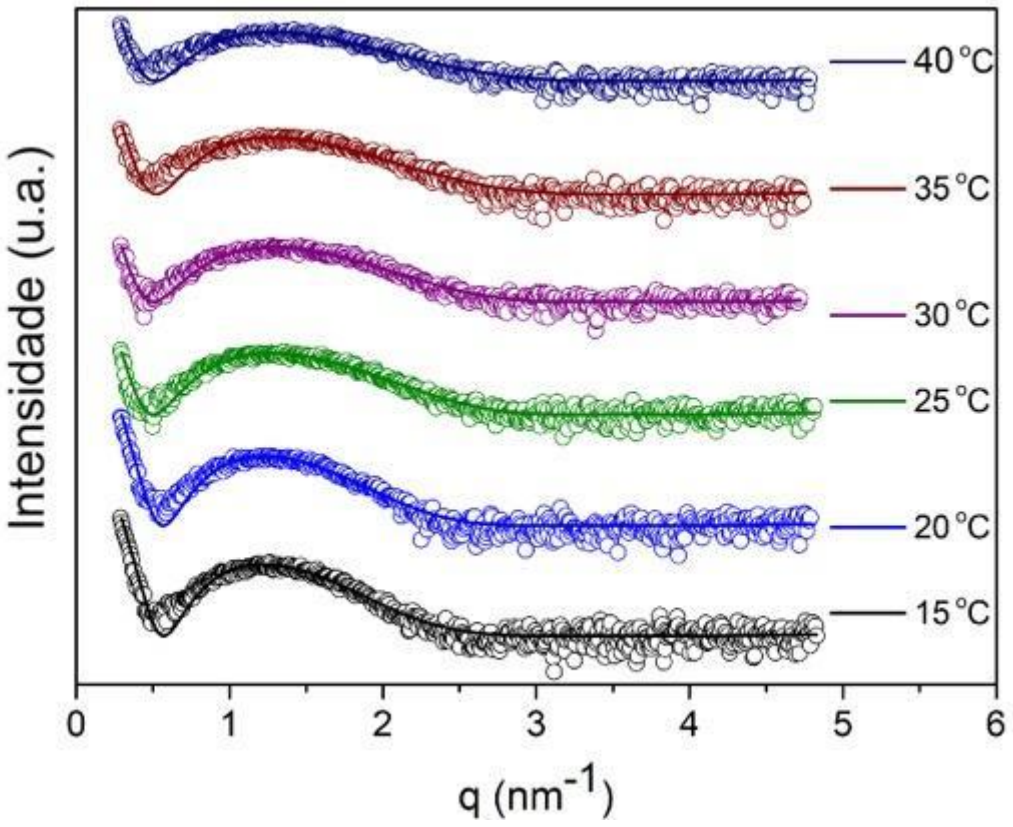

Intensidade (u.a.)
40 °C
35 °C
30 °C
25 °C
20 °C
15 °C
0
1
2
3
4
5
6
q (nm-1)

Fig. 3c

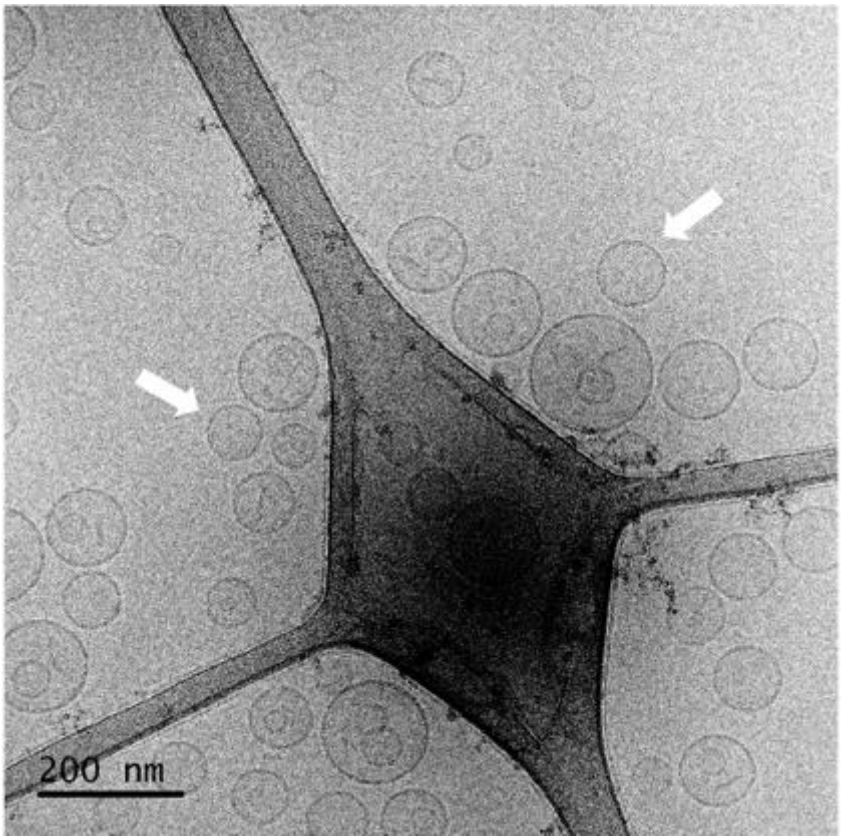


Fig. 3d

RESUMO

NANOLIPOSSOMA ANIÔNICO UNILAMELAR E PROCESSO DE PRODUÇÃO EM ÚNICA ETAPA DO MESMO

A presente descrição se refere a um nanolipossoma aniônico (AL) e um nanolipossoma aniônico stealth (AL), ambos unilamelares, com dimensões entre 52 e 58 nm e índice de polidispersão entre 0,05 e 0,09. Também é descrito seu processo de produção contínuo, em etapa única, utilizando um dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica (1), que consiste na injeção de uma mistura de fosfolipídios dispersa em solvente orgânico com baixa toxicidade numa entrada de fluido principal (2) do dispositivo microfluídico (1), concomitantemente com a injeção de uma solução salina (PBS) em pelo menos uma entrada de fluido radial (3) do dispositivo microfluídico (1), sendo recolhida uma solução com nanolipossomas aniônicos unilamelares em pelo menos uma saída de fluido (4) do dispositivo microfluídico (1).