



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

CARTA PATENTE Nº BR 102014028264-5

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

(21) Número do Depósito: BR 102014028264-5

(22) Data do Depósito: 13/11/2014

(43) Data da Publicação Nacional: 19/07/2016

(51) Classificação Internacional: A61K 35/00; A61K 49/18.

(54) Título: MICROVESÍCULAS DE NÚCLEO GASOSO COMPOSTAS POR FOSFOLIPÍDEOS E BIOPOLÍMEROS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2º ANDAR, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80010-200

(72) Inventor: ROBERTO PONTAROLO; GUILHERME FADEL PICHETH; ANA CRISTINA CAMARUZANO; RILTON ALVES DE FREITAS; MARIA RITA SIERAKOWSKI; GABRIEL ALBUQUERQUE TORRES KAMINSKI; CLEVERTON LUIZ PIRICH; LARISSA ANTONIACOMI DOS SANTOS.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 13/11/2014, observadas as condições legais

Expedida em: 28/06/2022

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

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



MICROVESÍCULAS DE NÚCLEO GASOSO COMPOSTAS POR FOSFOLÍPÍDEOS E BIOPOLÍMEROS

[001] A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de microvesículas contendo um núcleo gasoso composto por gases fluorados, como decafluorobutano e octafluoropropano, estabilizado por camadas de fosfolípídeos contendo polissacarídeos. Através de técnicas de revestimento, como emulsificação, deposição de camada-por-camada ou adsorção *in situ*, uma subestrutura de origem natural ou sintética, a qual pode ser constituída de um ou mais polissacarídeos, é incorporada ao material. O produto resultante apresenta potencial como agente de contraste para imagens biomédicas (por exemplo, para ressonância magnética e ultrassonografia), assim como veículo de liberação controlada de fármacos para terapias regenerativas de tecidos e órgãos de mamíferos.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002] Os agentes de contraste ultrassônicos (ACU) ou microvesículas são partículas gasosas estabilizadas por biomateriais tais como proteínas, lipídeos ou polímeros que apresentam diâmetro entre 2-10 μm (FERRARA,BORDEN e ZHANG 2009);(BORRELLI, O'BRIEN, BERNOCK et al., 2011).

[003] Quando estas partículas estão suspensas em um meio líquido podem ser utilizadas como contraste intravascular devido à capacidade de expansão e compressão de seus componentes quando submetidos a um campo ultrassônico (RAISINGHANI, RAFTER, PHILLIPS et al., 2004). A oscilação gerada produz sinais que são utilizados na formação de imagens úteis ao diagnóstico clínico de diversas doenças, disfunções e lesões (por exemplo, infarto agudo do miocárdio e detecção de tecidos cancerígenos) (FERRARA,BORDEN et al., 2009). A utilização destes materiais é imprescindível em pacientes com

obesidade e doenças pulmonares, as quais impedem a formação de imagens satisfatórias para um diagnóstico confiável. Os ACU devem ser administrados pela via intravenosa e atravessam os capilares sanguíneos antes de atingirem o coração e os órgãos internos, aonde a imagem é obtida (KABALNOV, KLEIN, PELURA et al., 1998). A sua remoção da circulação sistêmica é rápida, apresentando um tempo de meia-vida inferior a 15 minutos (SCHNEIDER e DECHER 2008). A escolha dos materiais para a composição dos ACU é de grande importância para a estabilidade do sistema e definirá o comportamento que o contraste assumirá *in vivo*, afetando a qualidade de formação de imagens e influenciando no resultado final do exame ultrassônico (BHATIA e SENIOR 2008). Já as propriedades físico-químicas do gás e do agente encapsulante determinarão o grau ecogênico, longevidade na circulação e capacidade de absorção de energia de ondas ultrassônicas da microvesícula (MARSHALL, SYKES, BERRY et al., 2011). Diversas composições de ACU foram estudadas ao longo do tempo, avançando de forma gradativa em qualidade. Os primeiros ACU utilizavam o ar ambiente como núcleo particular, e foram progressivamente substituídos por gases com baixa difusibilidade sanguínea. O mesmo ocorreu com os agentes presentes na interface que, inicialmente, foram compostos por estruturas proteicas, e evoluíram para materiais mais estáveis, como os fosfolípidos. Entretanto, as atuais formulações carecem de maior estabilidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os polissacarídeos, dentre outros biopolímeros, são largamente explorados na indústria, especialmente devido às suas propriedades estabilizantes e complexantes. Recentemente, alguns biopolímeros, como a quitosana e a galactomanana apresentaram a capacidade de estabilizar formulações contendo fosfolípidos, reduzindo a floculação e os efeitos tóxicos dos mesmos (QUEMENEUR, RINAUDO e

PEPIN-DONAT 2008). Além disso, a utilização de tais materiais se provou efetiva em aumentar o tempo de meia-vida in vivo de diversas formulações de uso intravenoso (SHENG, LIU, YUAN et al., 2009). A presença de biopolímeros como materiais interfaciais confere a capacidade à diversos materiais (por exemplo, micropartículas, nanopartículas e filmes bidimensionais) de serem modificados quimicamente através de processos brandos, como conjugação com anticorpos, proteínas e outros polímeros (DIAZ-LOPEZ, TSAPIS e FATTAL 2010), apresentando multifuncionalidades e diversas aplicações na área biomédica como um sistema de liberação responsável ao campo ultrassônico ou magnético.

Descrição da abordagem do problema técnico

[004] A dificuldade no preparo de ACU reside na estabilização dos componentes de interface com o gás de preferência. O efeito de contraste deve ser satisfatório para todos os pacientes na dose apresentada e para as diferentes técnicas empregadas. Portanto, o desenvolvimento de ACU para atender a demanda de novos procedimentos e garantir segurança ao paciente é relevante na área diagnóstica. Os agentes de contraste ultrassônicos utilizados nos exames (por exemplo, ecocardiografia e ressonância magnética) apresentam baixa estabilidade em solução aquosa e salina devido à alta difusão do componente gasoso para o meio líquido (DRESSAIRE, STONE, BEE et al., 2008). A eliminação do gás de forma precoce dificulta a avaliação clínica devido ao baixo número de partículas refratárias ao ultrassom e exige nova administração do produto, gerando riscos ao paciente, além de elevar o custo do processo. A instabilidade destes sistemas repercute também na diluição efetuada em meio salino, como é rotineiro em aplicações intravenosas. Além disso, o elevado potencial hidrofóbico dos gases utilizados dificulta a mistura dos ACU em soluções

aquosas durante o processo de diluição e administração no paciente, exigindo agitação da bomba de infusão para que a dose aplicada seja constante. A utilização de lipídeos *zwitteriônicos* poderia acarretar ainda maior estabilidade, funcionalidade e facilidade no preparo de sistemas de diagnóstico interno, uma vez que estes compreendem cadeias apolares extensas e uma extremidade polar, promovendo alta interação com o meio aquoso e dificultando a difusão do gás. Além disso, a camada de lipídeos é passível de sofrer expansão e compressão de sua área durante a aplicação de um campo ultrassônico devido às fracas forças de interação que a mantém unida. Portanto, a utilização de lipídeos como um molde para o revestimento molecular com biopolímeros (RINAUDO, AUZELY, VALLIN et al., 2005) é possível, podendo gerar uma ação sinérgica entre os componentes propostos, gerando uma maior estabilidade e, assim, promovendo características ultrassônicas favoráveis, além de fácil preparo, qualidades que os ACU atualmente não apresentam.

[005] O documento de patente **Gas-filled microvesicles with polymer-modified lipids - IN1243/CHENP/2009** (De WO2008028917 A1) descreve agentes de contraste com reforço imagem para utilização em métodos de diagnóstico e / ou terapêuticos, em particular sob a forma de microvesículas cheias com um gás, com uma estabilidade melhorada. As microvesículas são cheias de gás estabilizado por uma camada de material anfifílico e compreendem de 0,15% a 1,0% em moles de um lipídeo tendo um polímero hidrofílico. O lipídeo tendo um polímero hidrofílico é preferencialmente um fosfolipídeo ligado a polietilenoglicol.

[006] O revestimento molecular com polieletrólitos e biopolímeros visa diminuir a dissolução do núcleo gasoso e aumentar a sensibilidade do sistema à irradiação de campos ultrassônicos e magnéticos de baixa

intensidade. Para tal, a utilização de polieletrólitos e biopolímeros de baixo custo, com alta biocompatibilidade e baixa toxicidade podem ser empregadas. A maior estabilidade gerada por um sistema microvesicular revestido por biopolímeros possibilitará o maior tempo do efeito ultrassônico pelo sistema *in vivo* e facilidade de transferência, centrifugação, filtração e diluição do sistema, facilitando assim a administração da dose correta ao paciente e garantindo maior efetividade do sistema. Além disso, as características ultrassônicas dos componentes, como o gás, os fosfolípídeos e os biopolímeros, permitirão a obtenção de imagens de maior qualidade em amplitudes mais baixas de ultrassom ou campo magnético, facilitando o diagnóstico clínico e diminuindo a exposição do paciente a elevados campos ultrassônicos ou magnéticos.

[007] A Figura 1 mostra – Microfotografia de microscopia óptica com ampliação de 400X das microvesículas preparadas com quitosana. A barra de erro representa uma variação de 10 μm .

[008] A Figura 2 mostra – Microfotografia de microscopia de fluorescência com ampliação de 630X em óleo para as microvesículas preparadas com quitosana conjugada à isotiocianato de fluoresceína. A barra de erro representa uma variação de 10 μm .

[009] A Figura 3 mostra – Perfil térmico comparativo de microvesículas sem revestimento (linha preta) e contendo revestimento de quitosana (linha azul).

[010] A Figura 4 mostra – Espectros de ressonância magnética de ^{19}F analisados em função do tempo (de 30 minutos até 48 horas) para a amostra comercial e a amostra contendo o revestimento.

[011] O biopolímero tal como quitosana, é previamente solubilizado em ácido acético 0,5 mol/L, ou no caso de alginato ou galactomanana em água ultra-pura, em concentrações superiores a 1

mg/mL, por um tempo superior a 6 horas. O fosfolípídeo 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) deve ser solubilizado em volume superior a 5 mL de clorofórmio na concentração de 10 - 50 mg/mL, e à mistura são adicionados 0,5 - 2 mL da solução de quitosana, ou alginato ou galactomanana) sob constante agitação. A suspensão então é submetida a uma etapa de evaporação dos solventes, através rotaevaporador com temperatura acima de 20°C e 100 rpm durante períodos superiores à 1 hora. Em seguida, o material é hidratado com tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,4 contendo 10% v/v de glicerol e propilenoglicol sob constante agitação a 80°C por um tempo superior a 1 hora e então sonicado com sonicador de sonda de 1 - 10% de amplitude, durante intervalos superiores à 1 minuto. O gás fluorado decafluorobutano ou octafluoropropano é adicionado à solução em volumes superiores a 3 mL e, então, o material é sonicado na interface líquido-gás com 20 - 40% de amplitude por 10 - 60 segundos. O frasco é imediatamente fechado e resfriado à temperatura de 22°C.

EXEMPLO

[012] O biopolímero quitosana (Purifarma) foi previamente solubilizado em ácido acético 0,5 mol/L na concentração de 1 mg/mL por 18 horas. O fosfolípídeo 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC - Lipid GmHb) foi solubilizado em 5 mL de clorofórmio na concentração de 20 mg/mL, e à mistura foram adicionados 0,5 mL da solução de quitosana sob constante agitação. A suspensão então foi submetida a uma etapa de evaporação dos solventes, através de rotaevaporador com temperatura acima de 20°C e 100 rpm durante 2 horas. Em seguida, o material foi hidratado com tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,4 contendo 10% v/v de glicerol e propilenoglicol, sob constante agitação a 80°C por 3 horas; e, então, sonicado com sonicador de sonda (Misonix) de 10% de amplitude durante 3 ciclos de 30 segundos com

intervalos de 30 segundos. O gás fluorado decafluorobutano (Synquest) foi adicionado à solução em um volume de 10 mL e, então, o material foi sonificado na interface líquido-gás com 40% de amplitude por 10 segundos. O frasco foi imediatamente fechado e resfriado à temperatura de 22°C.

[013] O processo formou micropartículas com tamanhos de 2 a 10 μm como observado em microscopia óptica (Figura 1). O revestimento biopolimérico foi avaliado através de microscopia de fluorescência (Figura 2), que comprovou a presença da quitosana – marcada com fluorescência verde – depositada na interface das microvesículas. Ensaios de interação entre os materiais de interface - DSPC e a quitosana - foram efetuados através de análises de tensão superficial (tensiômetro Dataphysics OCA 15+) e microbalança de cristal de quartzo (Stanford Research Systems), estes resultados estão descritos na Tabela 1.

[014] Tabela 1: Valores para o excesso superficial (Γ_{max}), área mínima (a_{min}) e variação de frequência (Δf) para o DSPC e a mistura DSPC com quitosana.

Amostra	Γ_{max} (mol/m ²)	a_{min} (Å ²)	Δf (-Hz)
DSPC	$3.4 \pm 0.1 \times 10^{-6}$	48.2 ± 0.2	950 ± 30
DSPC + Quitosana	$3.1 \pm 0.1 \times 10^{-6}$	53.1 ± 0.1	105 ± 15

[015] Observa-se que a presença de quitosana provoca uma redução do excesso superficial, que é seguido por um aumento da área mínima, assim comprovando a interação entre o DSPC e a quitosana. O grau de adsorção foi verificado pela alteração de frequência, evidenciando uma queda abrupta de 100 Hz de quitosana a cada 950 Hz de DSPC depositado sobre a microbalança de cristal de quartzo. A inclusão do biopolímero altera consideravelmente o perfil térmico do

material avaliado em microcalorímetro (Micro DSC III Setaram) (Figura 3) de forma a estabilizá-lo frente ao incremento da temperatura quando comparado a um ACU utilizado atualmente. Estes resultados evidenciam a propriedade do biopolímero em revestir e assim promover uma estabilização superior às microvesículas.

Referências

[016] Bhatia, V. K. and R. Senior (2008). "Contrast Echocardiography: Evidence for Clinical Use." Journal of the American Society of Echocardiography **21**(5): 410-416.

[017] Borrelli, M. J., W. D. O'Brien, L. J. Bernock, H. J. Williams, E. Hamilton, J. Wu, M. L. Oelze and W. C. Culp (2011). "Production of uniformly sized serum albumin and dextrose microbubbles." Ultrasonics Sonochemistry.

[018] Diaz-Lopez, R., N. Tsapis and E. Fattal (2010). "Liquid perfluorocarbons as contrast agents for ultrasonography and (19)F-MRI." Pharm Res **27**(1): 1-16.

[019] Dressaire, E., H. A. Stone, R. Bee, D. C. Bell and A. Lips (2008). "Interfacial polygonal nanopatterning of stable microbubbles." Science **320**(5880): 1198-1201.

[020] Ferrara, K. W., M. A. Borden and H. Zhang (2009). "Lipid-Shelled Vehicles: Engineering for Ultrasound Molecular Imaging and Drug Delivery." Accounts of Chemical Research **42**(7): 881-892.

[021] Kabalnov, A., D. Klein, T. Pelura, E. Schutt and J. Weers (1998). "Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream: 1. Theory." Ultrasound in Medicine and Biology **24**(5): 739-749.

[022] Marshall, G., A. Sykes, J. Berry and L. Jonker (2011). "The "humble" bubble: Contrast-enhanced ultrasound." Radiography 1-5.

[023] Quemeneur, F., M. Rinaudo and B. Pepin-Donat (2008). "Influence of molecular weight and pH on adsorption of chitosan at the surface of large and giant vesicles." Biomacromolecules **9**(1): 396-402.

[024] Raisinghani, A., P. Rafter, P. Phillips, M. A. Vannan and A. N. DeMaria (2004). "Microbubble contrast agents for echocardiography: rationale, composition, ultrasound interactions, and safety." Cardiol Clin **22**: 171-180.

[025] Rinaudo, M., R. Auzely, C. Vallin and I. Mullagaliev (2005). "Specific interactions in modified chitosan systems." Biomacromolecules **6**(5): 2396-2407.

[026] Schneider, G. and G. Decher (2008). "Functional core/shell nanoparticles via layer-by-layer assembly. investigation of the experimental parameters for controlling particle aggregation and for enhancing dispersion stability." Langmuir **24**(5): 1778-1789.

[027] Sheng, Y., C. S. Liu, Y. Yuan, X. Y. Tao, F. Yang, X. Q. Shan, H. J. Zhou and F. Xu (2009). "Long-circulating polymeric nanoparticles bearing a combinatorial coating of PEG and water-soluble chitosan." Biomaterials **30**(12): 2340-2348.

REIVINDICAÇÕES

1 – MICROVESÍCULAS DE NÚCLEO GASOSO COMPOSTAS POR FOSFOLIPÍDEOS E BIOPOLÍMEROS, caracterizadas por um núcleo gasoso, ser estabilizado por uma camada constituída de fosfolipídeos 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) e quitosana obtidas pelo processo compreendido por:

- Solubilizar o biopolímero quitosana em ácido acético 0,5 mol/L em concentrações superiores a 1 mg/mL por um tempo superior a 6 horas;
- O fosfolipídeo 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) ser solubilizado em volume superior a 5 mL de clorofórmio na concentração de 10 - 50 mg/mL;
- Misturar e acondicionar 0,5 – 2 mL da solução de quitosana sob constante agitação;
- Submeter a suspensão a uma etapa de evaporação dos solventes, através de rotaevaporador com temperatura acima de 20°C e 100 rpm durante períodos superiores à 1 hora;
- Hidratar o material com tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,4 contendo 10% v/v de glicerol e propilenoglicol, sob constante agitação a 80°C por um tempo superior a 1 hora;
- Ser sonicado com sonicador de sonda de 1 - 10% de amplitude durante intervalos superiores a 1 minuto;
- Adicionar o gás fluorado decafluorobutano ou octafluoropropano à solução em volumes superiores a 3 mL;
- Sonicar o material na interface líquido-gás com 20 - 40% de amplitude por 10 - 60 segundos;
- Fechar o frasco imediatamente e resfriar a temperatura de 22°C.

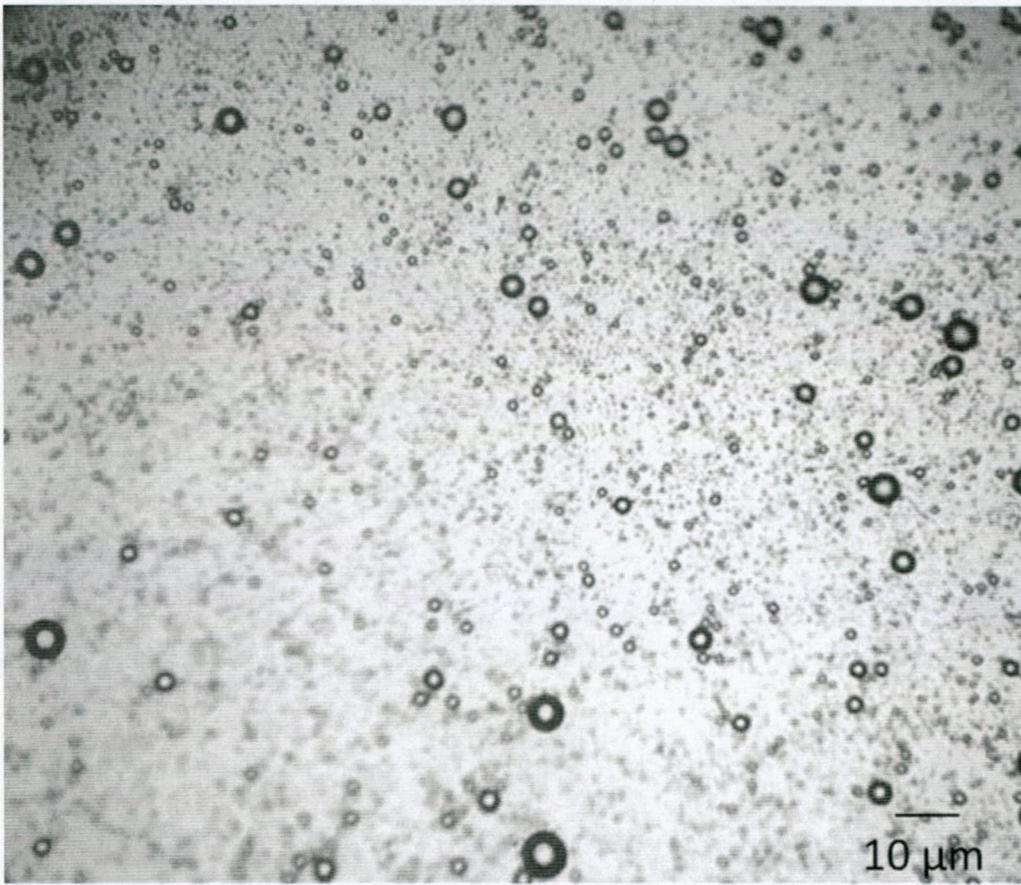
2 – MICROVESÍCULAS DE NÚCLEO GASOSO COMPOSTAS POR FOSFOLIPÍDEOS E BIOPOLÍMEROS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pela inclusão, durante a etapa de misturar e acondicionar, de compostos bioativos, compreendendo antibióticos, antifúngicos, antissépticos, anticâncer, fatores de crescimento celular, emolientes e/ou nanopartículas.

3 – MICROVESÍCULAS DE NÚCLEO GASOSO COMPOSTAS POR FOSFOLIPÍDEOS E BIOPOLÍMEROS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pela deposição superficial de compostos bioativos na superfície de filmes ou membranas ser pelo processo de *dipping*, compreendendo imersão em solução do composto bioativo, seguido de imersão por uma ou mais vezes em banho de lavagem.

1 / 4

• + •

Desenho 1



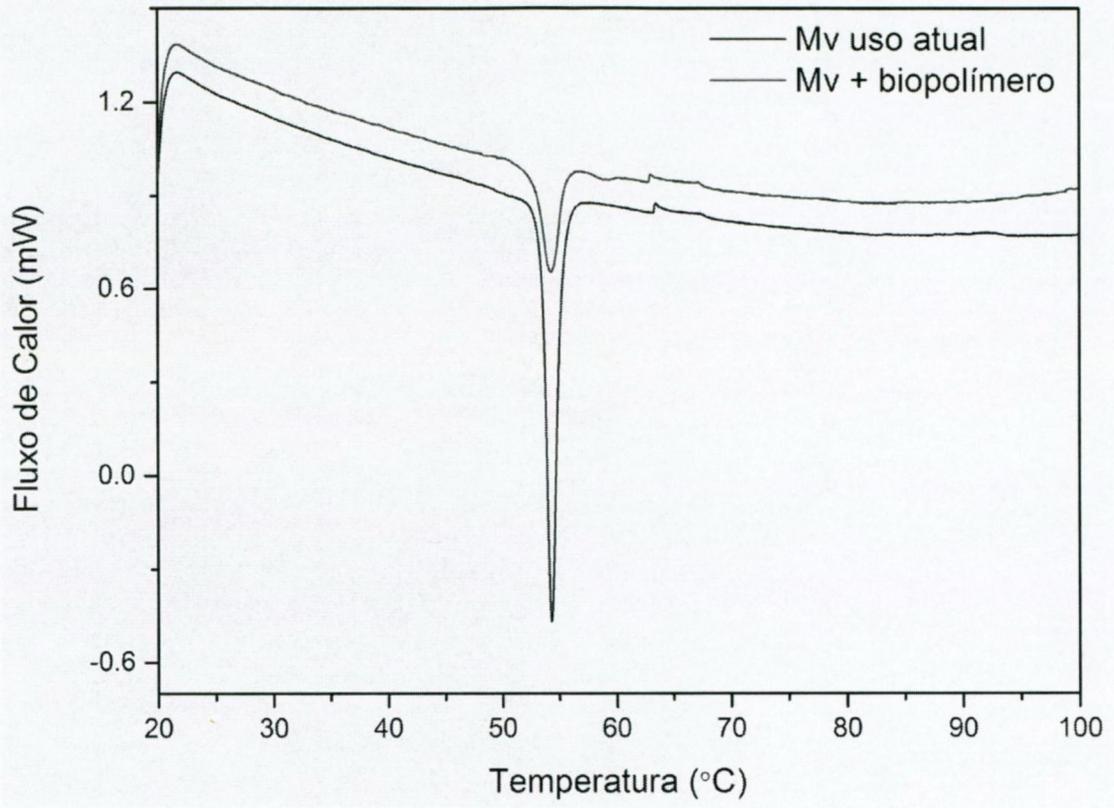
2 / 4

• • •

Desenho 2



Desenho 3



Desenho 4

