



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020008254-0 A2



(22) Data do Depósito: 24/04/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 01/02/2022

(54) **Título:** CUBOSSOMA, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEUS USOS

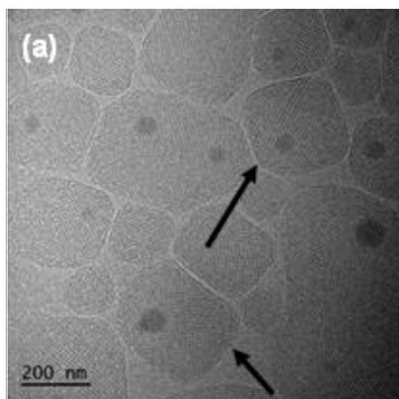
(51) **Int. Cl.:** A61K 9/127; A61P 25/00; A61P 31/00; A61P 35/00.

(52) **CPC:** A61K 9/1274; A61P 25/00; A61P 31/00; A61P 35/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

(72) **Inventor(es):** FERNANDA POLETTI; DENISE RAQUEL BOHN KOBELINSKI; GABRIEL WEBER ZIMMERMANN; MARCELO JUNG EBERHARDT; FABIANO BERNARDI.

(57) **Resumo:** CUBOSSOMA, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEUS USOS. A presente invenção descreve um cubossoma lipídico com um núcleo polimérico, e opcionalmente compreende nanozimas em seu interior. Especificamente, a presente invenção compreende um processo de obtenção de nanopartículas poliméricas encapsuladas em cubossomas e os usos desses sistemas. A presente invenção se situa nos campos da Química, Farmácia, Engenharia de Materiais e Nanotecnologia.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

CUBOSSOMA, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEUS USOS

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve um cubossoma lipídico com núcleo polimérico, e opcionalmente compreende nanozimas em seu interior. Especificamente, a presente invenção compreende um processo de obtenção de nanopartículas poliméricas encapsuladas em cubossomas e os usos desses sistemas. A presente invenção se situa nos campos da Química, Farmácia, Engenharia de Materiais e Nanotecnologia.

Antecedentes da Invenção

[0002] Cubossomas são dispersões coloidais compostas por lipídios polares que se estruturam como fases cúbicas bicontínuas reversas na presença de água. Esse tipo de estrutura de fase consiste em uma matriz lipídica com dois canais aquosos não-interconectados em seu interior, que forma-se espontaneamente e é termodinamicamente estável. O lipídio estruturado mantém-se disperso em meio aquoso pelo emprego de surfactantes/estabilizantes. Na literatura, a mistura de lipídios e polímeros para formar nanopartículas tipicamente resulta em nanocápsulas (núcleo de lipídio estruturado ou não, revestido por uma casca de polímero) [PI0700832], sistemas matriciais onde ambos os componentes (lipídio e polímero) estão homogeneamente misturados (com o lipídio podendo estar estruturado ou não) [Guterres *et al.*, 2000] ou cubossomas clássicos revestidos por polímero, geralmente, hidrofílico) [EP1529523, WO02/68561]. Sistemas do tipo núcleo-casca, envolvendo um núcleo polimérico e uma casca lipídica, são descritos na literatura como *lipid-polymer hybrid nanoparticles* [Kunn *et al.*, 2013].

[0003] Porém, estes sistemas diferem radicalmente da presente invenção, pois são formados a partir de um polímero covalentemente ligado a uma cadeia lipídica, cuja estruturação em meio aquoso não origina canais aquosos. Também

são encontrados relatos de sistemas com esta mesma denominação, porém relacionados à nanoesferas poliméricas envoltas por lipídio, o qual também não estrutura-se formando canais aquosos [WO2019135715]. Estruturas denominadas anfissomas, onde um núcleo polimérico catiônico é envolto por uma casca de lipídio anfifílico, foram previamente relatadas [BR10201806769], mas também diferem da presente invenção porque o lipídio não estrutura-se formando canais aquosos.

[0004] Nanozimas são miméticos funcionais de enzimas, ou seja, catalisam reações que enzimas naturais catalisam, porém não necessariamente através do mesmo mecanismo reacional. As nanozimas são tipicamente nanopartículas, as quais podem ser inorgânicas. Nanozimas livres no meio biológico são rapidamente revestidas por uma camada de proteína, conhecida como coroa proteica, que compromete suas propriedades de vetorização a locais específicos do organismo e pode inibir seus efeitos biológicos.

[0005] Na literatura, há relatos de modificação da superfície de nanozimas para regular a formação da coroa proteica, empregando-se zwitteríons, polietilenoglicol (PEG), carboidratos, proteínas disopsonicas, entre outros [Mizuhara *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2015; Daí *et al.*, 2014]. No entanto, essas estratégias são limitadas no que se refere a permitir vetorização porque, devido ao pequeno tamanho das nanozimas, estas não são capazes de realizar passagem seletiva por membranas biológicas (vetorização passiva), enquanto que a adição de ligantes em sua superfície para promover vetorização ativa acaba aumentando a propensão de formação da coroa proteica [Ke *et al.*, 2017].

[0006] Nanozimas inorgânicas incorporadas em polímeros ou revestidas pelos mesmos para aplicação biológica são descritas na literatura, porém são empregadas para uso tópico ou o sistema não impede que as nanozimas sejam lixiviadas para o meio externo antes de atingir o local de ação após administração no organismo por vias não-tópicas [WO2015/007961; KR10-2019-0113389; US8703200; WO2008/044685]. A síntese de nanozimas em meio lipídico estruturado na presença de água (fases líquido cristalinas cúbicas bicontínuas

reversas) também é relatada na literatura [Bohn *et al.*, 2018]. Porém, neste caso, as nanozimas são lixiviadas para o meio aquoso externo. Isso decorre do fato de que sua incorporação ou síntese *in situ* ocorre nos canais aquosos. Há relato de nanozimas em microemulsão [WO2013/151698], porém sua atividade biológica é menos eficaz que aquela observada para as nanozimas livres, pois o contato da sua superfície com o meio externo é dificultada. As nanozimas contidas no interior da fase lipídica da microemulsão não estão em contato com o meio aquoso externo.

[0007] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0008] No estado da técnica ainda há a necessidade de sistemas lipídicos carreadores de alta eficiência, e que contribuam para manter a ação dos ativos por um tempo prolongado.

Sumário da Invenção

[0009] Dessa forma, a presente invenção resolve os problemas do estado da técnica a partir de um cubossoma com núcleo polimérico no seu interior, opcionalmente o cubossoma com núcleo polimérico ainda compreende nanozimas no seu interior.

[0010] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um cubossoma compreendendo:

- a) uma região externa compreendendo pelo menos um lipídio polar estruturado em fase reversa, que apresenta bicamadas de lipídio retorcidas de tal forma que originam pelo menos dois canais aquosos não-interconectados em seu interior;
- b) pelo menos um surfactante internalizado nas bicamadas do lipídio polar;
- c) uma região interna compreendendo pelo menos um polímero orgânico insolúvel em água e no dito lipídio.

[0011] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de

obtenção de cubossoma compreendendo as etapas de:

- i) Misturar uma fase orgânica compreendendo pelo menos um lipídio polar na concentração de 0,1% a 4,0% (m/v) e pelo menos um polímero orgânico na concentração de 0,02% a 0,2% (m/v) com uma fase aquosa compreendendo pelo menos um surfactante na concentração de 0,2% a 0,01% (m/v), em que a proporção volumétrica de fase orgânica:aquosa é de 1:9 a 7:9, e os solventes são miscíveis em todas as proporções;
- ii) Remover o solvente orgânico.

[0012] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um cubossoma obtido por um processo compreendendo as etapas de:

- i) Misturar uma fase orgânica compreendendo pelo menos um lipídio polar na concentração de 0,1% a 4,0% (m/v) e pelo menos um polímero orgânico na concentração de 0,02% a 0,2% (m/v) com uma fase aquosa compreendendo pelo menos um surfactante na concentração de 0,2% a 0,01% (m/v), em que a proporção volumétrica de fase orgânica:aquosa é de 1:9 a 7:9, e os solventes são miscíveis em todas as proporções;
- ii) Remover o solvente orgânico.

[0013] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica compreendendo um excipiente farmacêuticamente aceitável e um cubossoma compreendendo:

- a) uma região externa compreendendo pelo menos um lipídio polar estruturado em fase reversa, que apresenta bicamadas de lipídio retorcidas de tal forma que originam pelo menos dois canais aquosos não-interconectados em seu interior;
- b) pelo menos um surfactante internalizado nas bicamadas do lipídio polar;
- c) uma região interna compreendendo pelo menos um polímero orgânico insolúvel em água e no dito lipídio.

[0014] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta um uso de um cubossoma para preparar um medicamento para tratar doenças do sistema nervoso central, esclerose múltipla, câncer e/ou infecções bacterianas, em que o cubossoma compreende:

- a) uma região externa compreendendo pelo menos um lipídio polar estruturado em fase reversa, que apresenta bicamadas de lipídio retorcidas de tal forma que originam pelo menos dois canais aquosos não-interconectados em seu interior;
- b) pelo menos um surfactante internalizado nas bicamadas do lipídio polar;
- c) uma região interna compreendendo pelo menos um polímero orgânico insolúvel em água e no dito lipídio.

[0015] Em um sexto objeto, a presente invenção apresenta um uso de um cubossoma para análise de substratos, em que o cubossoma compreende:

- a) uma região externa compreendendo pelo menos um lipídio polar estruturado em fase reversa, que apresenta bicamadas de lipídio retorcidas de tal forma que originam pelo menos dois canais aquosos não-interconectados em seu interior;
- b) pelo menos um surfactante internalizado nas bicamadas do lipídio polar;
- c) uma região interna compreendendo pelo menos um polímero orgânico insolúvel em água e no dito lipídio.

[0016] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos detalhadamente a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0017] São apresentadas as seguintes figuras:

[0018] A figura 1 mostra imagens de criomicroscopia eletrônica de transmissão de (a) cubossoma de fitantriol contendo núcleo polimérico em seu interior (estabilizante: polissorbato 80), (b) cubossoma de fitantriol clássico, sem adição de polímero (estabilizante: polissorbato 80), (c) cubossoma de fitantriol com adição de polímero, porém sem a formação de núcleo polimérico em seu interior (estabilizante: poloxamer F127). As setas apontam para as estruturas que correspondem a cubossomas.

[0019] A figura 2 mostra imagens da distribuição de tamanho de partícula (25 °C), obtida por espalhamento dinâmico de luz com tratamento de dados pelo algoritmo CONTIN, de (a) cubossomas de fitantriol estabilizados por polissorbato 80 com e sem adição de polímero na preparação, e (b) de cubossomas de

fitantriol estabilizados por poloxamer F127 com e sem adição de polímero na preparação; Curvas de espalhamento de raios X a baixos ângulos medidas a 40 °C (c) de cubossomas de fitantriol estabilizados por polissorbato 80 com e sem adição de polímero na preparação, e (d) de cubossomas de fitantriol estabilizados por poloxamer F127 com e sem adição de polímero na preparação.

[0020] A figura 3 mostra uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão de cubossomas de fitantriol com núcleo polimérico, contendo nanozimas de óxido de cério(IV) aprisionadas em seu interior.

Descrição Detalhada da Invenção

[0021] A presente invenção descreve como encapsular nanopartículas poliméricas em cubossomas e aprisionar nanozimas inorgânicas em seu interior para protegê-las da passivação causada pela formação de coroa proteica em meio biológico. Este sistema do tipo núcleo-casca para nanopartículas poliméricas no interior de cubossomas é novo e inventivo.

[0022] O sistema consiste em uma formulação aquosa de baixa viscosidade que pode ser diretamente aplicada por vias parenterais (desde que preparada de forma estéril) ou empregada como insumo na composição de outras formas farmacêuticas para vias enteral e tópica. A presente invenção pode ser utilizada para preparar medicamentos para tratar doenças pela catálise de uma reação de interesse a partir de substratos de pequeno tamanho via ação das nanozimas. Como exemplos de doenças nesse contexto, pode-se citar esclerose múltipla, câncer, infecções bacterianas etc.

[0023] Os sistemas também possuem potencial para atuarem como componentes de ensaios analíticos que determinam a presença de substratos variados, tais como ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio, glicose, entre outros.

[0024] Para o efeito surpreendente de encapsulamento de nanopartículas poliméricas em cubossomas (estruturas lipídicas que apresentam canais aquosos em seu interior) deve-se utilizar um lipídio polar capaz de estruturar-se

na presença de água em fases reversas que apresentem canais aquosos (fases cúbicas bicontínuas ou fase hexagonal), um ou mais surfactantes capazes de serem internalizados nas bicamadas do lipídio em questão (e que, mesmo assim, não impeçam a formação dos canais aquosos) e um polímero orgânico policatiônico ou polianiônico com alta afinidade pelo surfactante, porém insolúvel em água e no lipídio. É importante mencionar que se trata de um processo de uma única etapa, onde a nanopartícula polimérica (núcleo) e o cubossoma que a reveste são formados simultaneamente.

[0025] Em uma concretização, o processo de obtenção do cubossoma com núcleo polimérico é do tipo *bottom-up*, no qual uma fase orgânica, contendo o lipídio polar e o polímero, é vertida em uma fase aquosa contendo um ou mais surfactantes. Os solventes dessas duas fases devem ser miscíveis em todas as proporções (exemplo: acetona e água, etanol e água etc.). O solvente orgânico é removido por pressão reduzida, uso de membranas ou outra técnica correlata. A formulação pode ser concentrada no que se refere à remoção da água, empregando-se pressão reduzida ou técnicas correlatas. Esse processo, de forma geral, é empregado para obter outros tipos de estruturas, como nanocápsulas poliméricas, lipossomas, nanoesferas poliméricas, cubossomas clássicos (sem núcleo polimérico), entre outros. A proporção solvente/água pode estar na faixa de 1/9 (v/v) a 7/9 (v/v), em uma concretização a proporção é 5:9 (v/v).

[0026] Para ocorrer a estruturação da nanopartícula polimérica no cubossoma como um sistema núcleo-casca, é fundamental que o surfactante tenha afinidade pelo polímero e seja capaz de intercalar-se nas bicamadas formadas pelo lipídio polar estruturado em meio aquoso. Durante o processo de preparação do sistema, mais especificamente durante a remoção do solvente, a nucleação do polímero no meio deve ocorrer antes da formação da fase cúbica bicontínua reversa. Surfactantes capazes de intercalar-se nas bicamadas do lipídio polar resultam em estruturação tardia da fase cúbica bicontínua reversa, levando à obtenção do sistema núcleo-casca ao final do processo. Quando o surfactante é

capaz de intercalar-se na bicamada lipídica, a mistura de lipídio e surfactante encontra-se na forma de micelas no início do processo, estruturando-se como fase cúbica bicontínua reversa apenas no final do processo. A remoção completa de solvente ao final do processo induz a transição de fase das micelas, formando a casca de lipídio estruturado como fase cúbica bicontínua reversa ao redor do núcleo polimérico. A utilização de um surfactante com afinidade pelo polímero, mas que não é capaz de intercalar-se nas bicamadas lipídicas, não promove a estruturação do tipo núcleo-casca, mantendo o polímero depositado na superfície do cubossoma. Os estabilizantes (surfactantes) adicionados à fase aquosa (na faixa de 0,2% a 0,01% m/v) podem ser ésteres ou amidas de ácido graxo ou análogos de éter, ou derivados hidrofílicos destes; monoésteres ou diésteres, ou derivados hidrofílicos destes; ou misturas destes; monoglicerídeos ou diglicerídeos, ou derivados hidrofílicos destes; ou misturas destes; misturas que possuem mono- e/ou diglicerídeos enriquecidos, ou derivados hidrofílicos destes; tensoativos parcialmente derivatizados com uma porção hidrofílica; monoésteres ou diésteres ou ésteres múltiplos de outros álcoois, polióis, sacarídeos ou oligossacarídeos ou polissacarídeos, oligômeros ou polímeros de oxialquileno ou polímeros em bloco, ou derivados hidrofílicos destes, ou os análogos de amida destes; derivados de ácido graxo de aminas, poliaminas, poliiiminas, aminoalcoóis, amino-açúcares, hidroxialquilaminas, hidroxipoliiiminas, peptídeos, polipeptídeos, ou os análogos de éter destes.

[0027] A fase orgânica deve conter lipídio polar na faixa de 0,1% a 4,0 % (m/v) e polímero na faixa de 0,02% a 0,2% (m/v). Exemplos de lipídios incluem monooleato de glicerila, fitantriol, monolinoleína, monoelaidina, fosfatidiletanolamina, oleioiletanolamina, fosfolipídios, fosfolipídios PEGilados, gliceratos de alquila e glicolipídios. É possível incluir aditivo(s) para induzir transições de fase, em concentrações na faixa de 0,01 a 0,10 % (m/v), os quais podem ser ésteres de cadeia média ou longa, ácidos graxos, aminas graxas, glicolipídios, fosfolipídios ou éteres de cadeia média ou longa. O polímero deve ser um polycation ou poliânion, linear ou ramificado, insolúvel em água e no lipídio

polar, mas solúvel no solvente orgânico, com massa molar na faixa de 1 a 400 kDa. Exemplos de polímeros catiônicos incluem polietilenoimina e seus derivados, poliarilamina e seus derivados e derivados de polidicianodiamina. Exemplos de polímeros aniônicos incluem derivados do poli(ácido maleico), bem como poli(ácido acrílico) e seus derivados.

[0028] O sistema tipo núcleo-casca para aprisionar nanozimas inorgânicas em seu interior permite que elas sejam protegidas da passivação causada pela formação de coroa proteica em sua superfície após contato com meio biológico. Além disso, por permanecerem aprisionadas no sistema, que possui diâmetro hidrodinâmico e características de superfície compatíveis com a vetorização para órgãos como cérebro, rins, fígado e regiões de tumores sólidos, é possível propor a vetorização das nanozimas para estes órgãos e regiões sem a necessidade de funcionalização ou modificação estrutural das mesmas.

[0029] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um cubossoma compreendendo:

- a) uma região externa compreendendo pelo menos um lipídio polar estruturado em fase reversa, que apresenta bicamadas de lipídio retorcidas de tal forma que originam pelo menos dois canais aquosos não-interconectados em seu interior;
- b) pelo menos um surfactante internalizado nas bicamadas do lipídio polar;
- c) uma região interna compreendendo pelo menos um polímero orgânico insolúvel em água e no dito lipídio.

[0030] Em uma concretização, o cubossoma compreende na sua região interna pelo menos uma nanozima com diâmetro médio superior ao diâmetro dos canais aquosos do cubossoma.

[0031] Em uma concretização, o cubossoma compreende:

- a) 70% a 85% em massa de pelo menos um lipídio polar selecionado do grupo consistindo de monooleato de glicerila, fitantriol, monolinoleína, monoelaidina, fosfatidiletanolamina, oleioiletanolamina, fosfolipídios, fosfolipídios PEGilados, gliceratos de alquila e glicolipídios;
- b) 15% a 20% em massa de pelo menos um surfactante selecionado do grupo

consistindo de ácido graxo; monoésteres ou diésteres; monoglicerídeos ou diglicerídeos; mono- e/ou diglicerídeos enriquecidos; tensoativos parcialmente derivatizados com uma porção hidrofílica; monoésteres ou diésteres ou ésteres múltiplos de outros álcoois, polióis, sacarídeos ou oligossacarídeos ou polissacarídeos, oligômeros ou polímeros de oxialquileno ou polímeros em bloco; derivados de ácido graxo de aminas, poliaminas, poliiminas, aminoalcoóis, amino-açúcares, hidroxialquilaminas, hidroxipoliiminas, peptídeos, polipeptídeos; análogos de éter ou de amida destes surfactantes; derivados hidrofílicos destes surfactantes; ou combinações dos mesmos;

c) 1% a 10% em massa de pelo menos um polímero orgânico com massa molar na faixa de 1 kDa a 400 kDa, selecionado do grupo consistindo de polietilenoimina, poliarilamina, polidicianodiamina, poli(ácido maleico), poli(ácido acrílico) e seus derivados;

d) 0,5% a 10% em massa de pelo menos um aditivo indutor de transição de fase selecionado do grupo consistindo de ésteres de cadeia média ou longa, ácidos graxos, aminas graxas, glicolipídios, fosfolipídios ou éteres de cadeia média ou longa;

e) 0,1% a 2% em massa de pelo menos uma nanozima inorgânica, selecionada do grupo consistindo de nanopartículas de cério, ferro, platina e manganês.

[0032] Entende-se que no cálculo de massa desconsidera-se a massa de meio aquoso externo, tipicamente água.

[0033] Em uma concretização, o cubossoma compreende 75% em massa de pelo menos um lipídio polar, 18% em massa de pelo menos um surfactante, 5% em massa de um polímero orgânico, 1% em massa de pelo menos um aditivo indutor de transição de fase e 1% em massa de pelo menos uma nanozima inorgânica.

[0034] Em uma concretização, o lipídio deve possuir uma região hidrofóbica (que pode ser uma cadeia carbônica linear ou ramificada, saturada ou com insaturações) e uma região hidrofílica (esta deve ser não-iônica ou zwitteriônica; não pode ser catiônica ou aniônica – grupo funcional típico é a hidroxila, podendo

estar presentes, mas não limitando-se, os grupos éster ou amida). Não há um conjunto bem definido de características físicoquímicas descritas na literatura que permitam prever se uma molécula se estrutura em fases reversas não-lamelares. No entanto, a geometria molecular pode ser um indicativo: o parâmetro de empacotamento crítico (CPP na sigla em inglês) deve ser maior que 1. O diagrama de fase ternário deve evidenciar que o lipídio, na presença de água, apresente fase cúbica bicontínua reversa em faixa de temperatura compatível com o uso biológico.

[0035] Em uma concretização, o surfactante deve apresentar uma porção hidrofílica (tipicamente polímero ou oligômero derivado do óxido de etileno, mas não limitado a ele) e uma porção hidrofóbica que garanta sua interação com a porção hidrofóbica da bicamada do lipídio (ou seja, uma cadeia carbônica com 8 a 20 carbonos, podendo ser saturada ou insaturada, linear ou ramificada).

[0036] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de cubossoma compreendendo as etapas de:

i) Misturar uma fase orgânica compreendendo pelo menos um lipídio polar na concentração de 0,1% a 4,0% (m/v) e pelo menos um polímero orgânico na concentração de 0,02% a 0,2% (m/v) com uma fase aquosa compreendendo pelo menos um surfactante na concentração de 0,2% a 0,01% (m/v), em que a proporção volumétrica de fase orgânica:aquosa é de 1:9 a 7:9, e os solventes são miscíveis em todas as proporções;

ii) Remover o solvente orgânico.

[0037] Em uma concretização, a etapa de remover o solvente orgânico é realizada por pressão reduzida ou uso de membranas.

[0038] Em uma concretização, o processo compreende na fase orgânica pelo menos um aditivo indutor de transição de fase na concentração de 0,01% a 0,10% (m/v).

[0039] Em uma concretização, o processo compreende uma etapa de:

iii) Complexar um precursor de nanozima com o polímero orgânico da região interna do cubossoma, seguido de síntese *in situ* da nanozima na região interna.

[0040] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um cubossoma obtido por um processo compreendendo as etapas de:

i) Misturar uma fase orgânica compreendendo pelo menos um lipídio polar na concentração de 0,1% a 4,0% (m/v) e pelo menos um polímero orgânico na concentração de 0,02% a 0,2% (m/v) com uma fase aquosa compreendendo pelo menos um surfactante na concentração de 0,2% a 0,01% (m/v), em que a proporção volumétrica de fase orgânica:aquosa é de 1:9 a 7:9, e os solventes são miscíveis em todas as proporções;

ii) Remover o solvente orgânico.

[0041] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica compreendendo um excipiente farmacêuticamente aceitável e um cubossoma compreendendo:

a) uma região externa compreendendo pelo menos um lipídio polar estruturado em fase reversa, que apresenta bicamadas de lipídio retorcidas de tal forma que originam pelo menos dois canais aquosos não-interconectados em seu interior;

b) pelo menos um surfactante internalizado nas bicamadas do lipídio polar;

c) uma região interna compreendendo pelo menos um polímero orgânico insolúvel em água e no dito lipídio.

[0042] Em uma concretização, a composição farmacêutica compreende um cubossoma obtido por um processo compreendendo as etapas de:

i) Misturar uma fase orgânica compreendendo pelo menos um lipídio polar na concentração de 0,1% a 4,0% (m/v) e pelo menos um polímero orgânico na concentração de 0,02% a 0,2% (m/v) com uma fase aquosa compreendendo pelo menos um surfactante na concentração de 0,2% a 0,01% (m/v), em que a proporção volumétrica de fase orgânica:aquosa é de 1:9 a 7:9, e os solventes são miscíveis em todas as proporções;

ii) Remover o solvente orgânico.

[0043] Em uma concretização, uma fase orgânica compreendendo pelo menos um lipídio polar 0,005 g/mL a 0,100 g/mL, pelo menos um polímero orgânico 0,00035 g/mL a 0,00100 g/mL, e pelo menos um aditivo indutor de transição de

fase 0,0005 g/mL a 0,0010 g/mL é vertido em uma fase aquosa compreendendo surfactante 0,0005 g/mL a 0,0100 g/mL, e em seguida o solvente orgânico é removido por pressão reduzida.

[0044] Em um quinto objeto, a presente invenção apresenta um uso de um cubossoma para preparar um medicamento para tratar doenças do sistema nervoso central, esclerose múltipla, câncer e/ou infecções bacterianas, em que o cubossoma compreende:

- a) uma região externa compreendendo pelo menos um lipídio polar estruturado em fase reversa, que apresenta bicamadas de lipídio retorcidas de tal forma que originam pelo menos dois canais aquosos não-interconectados em seu interior;
- b) pelo menos um surfactante internalizado nas bicamadas do lipídio polar;
- c) uma região interna compreendendo pelo menos um polímero orgânico insolúvel em água e no dito lipídio.

[0045] Em uma concretização, o cubossoma utilizado no preparo de um medicamento é obtido por um processo compreendendo as etapas de:

- i) Misturar uma fase orgânica compreendendo pelo menos um lipídio polar na concentração de 0,1% a 4,0% (m/v) e pelo menos um polímero orgânico na concentração de 0,02% a 0,2% (m/v) com uma fase aquosa compreendendo pelo menos um surfactante na concentração de 0,2% a 0,01% (m/v), em que a proporção volumétrica de fase orgânica:aquosa é de 1:9 a 7:9, e os solventes são miscíveis em todas as proporções;
- ii) Remover o solvente orgânico.

[0046] Em um sexto objeto, a presente invenção apresenta um uso de um cubossoma para análise de substratos, em que o cubossoma compreende:

- a) uma região externa compreendendo pelo menos um lipídio polar estruturado em fase reversa, que apresenta bicamadas de lipídio retorcidas de tal forma que originam pelo menos dois canais aquosos não-interconectados em seu interior;
- b) pelo menos um surfactante internalizado nas bicamadas do lipídio polar;
- c) uma região interna compreendendo pelo menos um polímero orgânico insolúvel em água e no dito lipídio.

[0047] Em uma concretização, o cubossoma utilizado para análise de substratos é obtido por um processo compreendendo as etapas de:

i) Misturar uma fase orgânica compreendendo pelo menos um lipídio polar na concentração de 0,1% a 4,0% (m/v) e pelo menos um polímero orgânico na concentração de 0,02% a 0,2% (m/v) com uma fase aquosa compreendendo pelo menos um surfactante na concentração de 0,2% a 0,01% (m/v), em que a proporção volumétrica de fase orgânica:aquosa é de 1:9 a 7:9, e os solventes são miscíveis em todas as proporções;

ii) Remover o solvente orgânico.

[0048] Em uma concretização, a análise de substrato é realizada para diagnosticar doenças.

[0049] A presente invenção permite, a partir de uma combinação determinada de componentes da formulação, obter nanopartículas poliméricas encapsuladas no interior de cubossomas constituídos por lipídio polar. No núcleo desse sistema núcleo-casca, é possível sintetizar nanozimas (nanopartículas inorgânicas que mimetizam a ação de enzimas) *in situ*, de forma a aprisioná-las fisicamente. A presente invenção pode agir como um mecanismo de proteção das nanozimas porque a casca formada pelo cubossoma atua como uma barreira semipermeável, que pode permitir o livre acesso de água ou substratos de pequeno tamanho à superfície das nanozimas, porém impedindo o contato destas com proteínas do meio biológico que poderiam induzir a formação da coroa proteica.

[0050] O aprisionamento das nanozimas no sistema núcleo-casca evita a formação de coroa proteica na sua superfície, o que leva a uma maior eficiência biológica (pois o revestimento das nanozimas com proteína muitas vezes causa sua passivação). O método de preparação é simples e utiliza água e solvente de baixa toxicidade, bem como não requer alta energia ou compostos químicos/biotecnológicos altamente sofisticados que poderiam encarecer o produto final.

[0051] O aprisionamento das nanozimas no sistema descrito neste relatório é

físico: primeiramente, é realizada síntese *in situ* das nanozimas no núcleo polimérico, de forma que após a nucleação e crescimento da nanozima, esta atinja diâmetros superiores aos dos canais aquosos da casca de cristal líquido liotrópico. Dessa forma, sua difusão para o meio externo fica impedida, porém o contato de sua superfície com este meio (exceto macromoléculas, tais como as proteínas que formam a coroa proteica) permanece livre devido aos canais aquosos.

[0052] Na presente invenção entende-se por cubossoma qualquer estrutura com fase cúbica reversa, dispersa em água na escala nanométrica, que apresente canais aquosos em seu interior decorrente da sua estruturação. Exemplos dessas estruturas compreendem esferas, cubos, ou qualquer outra forma geométrica. Em uma concretização, essa estrutura é formada principalmente por lipídios polares.

Exemplo

[0053] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Preparação dos Cubossomas com Núcleo Polimérico

[0054] Uma fase orgânica de etanol (20 mL) compreendendo fitantriol 0,010 g/mL e polímero do ácido lipoico obtido por polimerização térmica 0,00075 g/mL foi vertido em uma fase aquosa (45 mL) compreendendo polissorbatos 80 0,001 g/mL. A fase orgânica foi então removida por pressão reduzida obtendo-se uma formulação de cubossomas contendo um núcleo polimérico em seu interior.

Síntese *in situ* da nanozima

[0055] Adicionou-se nitrato de cério (III) hexaidratado (1 a 4 mg, sendo idealmente 2,37 mg, em 10 mL de formulação) à formulação de cubossomas de fitantriol estabilizadas por polissorbatos 80, contendo um núcleo de poli(ácido lipoico). Este possui carboxilatos e ligação dissulfeto como sítios para complexação com $Ce^{3+}_{(aq)}$. Após agitação por no mínimo 12 h, adicionou-se

peróxido de hidrogênio (10 a 80 mM, idealmente 50 mM) para induzir a formação *in situ* de nanopartículas de óxido de cério (IV), que são miméticos de enzimas redox largamente descritos na literatura.

[0056] A observação das nanopartículas de óxido de cério no interior do sistema núcleo-casca foi feita por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 3). Fica evidente a formação das nanopartículas, que corresponde às estruturas mais eletrodensas no interior do núcleo polimérico.

[0057] Os sistemas foram caracterizados quanto à sua morfologia por criomicroscopia eletrônica de transmissão (Figura 1), espalhamento de luz dinâmico (Figura 2a) e espalhamento de raios X a baixos ângulos (Figura 2b). As imagens de criomicroscopia eletrônica de transmissão mostram uma estrutura do tipo núcleo-casca (Figura 1a) de um sistema preparado com fitantriol, polissorbato 80 e polímero do ácido lipoico, onde fica evidente a nanopartícula polimérica mais eletrodensa no interior de um cubossoma de fitantriol. Para fins de comparação, é mostrada também a imagem (Figura 1b) de um sistema semelhante preparado com polissorbato 80 como surfactante e na ausência de polímero, que portanto não contém nanopartícula polimérica em seu interior. A substituição de polissorbato 80 por poloxamer F127 na formulação preparada na presença de polímero leva a um sistema que não é do tipo núcleo-casca (Figura 1c) porque este surfactante, de acordo com a literatura, não é capaz de intercalar-se nas bicamadas de fitantriol, permanecendo depositado na superfície do cubossoma. Portanto, o polímero, nesse caso, fica depositado na superfície do cubossoma, e não em seu interior.

[0058] O diâmetro hidrodinâmico (Figura 2) do sistema núcleo-casca corresponde a 276 (\pm 10) nm (cubossoma de fitantriol contendo núcleo polimérico, estabilizado por polissorbato 80). O sistema equivalente sem polímero e estabilizado por polissorbato 80 apresenta diâmetro de 280 (\pm 26) nm. O sistema preparado com fitantriol, polímero e poloxamer F127 (não se organiza como núcleo polimérico-casca), apresenta diâmetro de 366 (\pm 20) nm. O mesmo sistema, porém preparado sem polímero, apresenta diâmetro de 272

(± 3) nm. Esses valores são comparáveis àqueles tipicamente descritos na literatura para cubossomas clássicos de lipídio polar. A distribuição de tamanho de partícula é monomodal em todos os casos, e o tamanho médio é inferior a 400 nm, o que é desejável para aplicação biológica enteral e parenteral.

[0059] A estrutura de fase dos sistemas foi confirmada por espalhamento de raios X a baixos ângulos (Figura 2b). A indexação dos picos na curva obtida para os cubossomas com e sem núcleo polimérico estabilizados por polissorbato 80 correspondeu a $\sqrt{2}$, $\sqrt{4}$ e $\sqrt{6}$. Isso é indicativo de fase cúbica bicontínua reversa de grupo espacial $Im3m$. Por sua vez, a utilização de poloxamer F127 como estabilizante resultou em uma indexação de $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, $\sqrt{4}$ e $\sqrt{6}$, que corresponde à fase cúbica bicontínua reversa de grupo espacial $Pn3m$. Fitatriol puro em água forma fase com grupo espacial $Pn3m$. O poloxamer F127 não interfere na estrutura de fase típica da mistura fitatriol:água porque não se intercala nas bicamadas lipídicas. Uma transição para fase $Im3m$ ocorre na presença de polissorbato 80 porque ele é capaz de intercalar-se com o fitatriol na bicamada lipídica.

Composição farmacêutica

[0060] Para uso parenteral (intramuscular, subcutâneo, intradérmico, intravenoso, intratecal), a formulação pode ser injetada tal qual preparada, desde que esteja estéril; é possível torná-la isosmótica pela adição de NaCl em concentrações que dependem de cada via – tipicamente 0,9% m/v.

Creme para uso tópico (pele e mucosas, vaginal ou retal) consiste de 0,5 g de Carbômero 940, qsp de Trietanolamina e 100 mL da formulação de cubossomas obtida no exemplo anterior.

[0061] Podem-se adicionar conservantes adequados às vias de administração, como nipagim e nipazol, parabenos, diazolidinil ureia, isotiazolinonas etc.

[0062] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativas, abrangidas pelo escopo das reivindicações a seguir.

Reivindicações

1. Cubossoma **caracterizado por** compreender:

- a) uma região externa compreendendo pelo menos um lipídio polar estruturado em fase reversa, que apresenta bicamadas de lipídio retorcidas de tal forma que originam pelo menos dois canais aquosos não-interconectados em seu interior;
- b) pelo menos um surfactante internalizado nas bicamadas do lipídio polar;
- c) uma região interna compreendendo pelo menos um polímero orgânico insolúvel em água e no dito lipídio.

2. Cubossoma, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender na sua região interna pelo menos uma nanozima com diâmetro médio superior ao diâmetro dos canais aquosos do cubossoma.

3. Cubossoma, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado por** compreender:

- a) 70% a 85% em massa de pelo menos um lipídio polar selecionado do grupo consistindo de monooleato de glicerila, fitantriol, monolinoleína, monoelaidina, fosfatidiletanolamina, oleoiletanolamina, fosfolipídios, fosfolipídios PEGilados, gliceratos de alquila e glicolipídios;
- b) 15% a 20% em massa de pelo menos um surfactante selecionado do grupo consistindo de ácido graxo; monoésteres ou diésteres; monoglicerídeos ou diglicerídeos; mono- e/ou diglicerídeos enriquecidos; tensoativos parcialmente derivatizados com uma porção hidrofílica; monoésteres ou diésteres ou ésteres múltiplos de outros álcoois, polióis, sacarídeos ou oligossacarídeos ou polissacarídeos, oligômeros ou polímeros de oxialquileno ou polímeros em bloco; derivados de ácido graxo de aminas, poliaminas, poliiminas, aminoalcoóis, amino-açúcares, hidroxialquilaminas, hidroxipoliiminas, peptídeos, polipeptídeos; análogos de éter ou de amida destes surfactantes; derivados hidrofílicos destes surfactantes; ou combinações dos mesmos;
- c) 1% a 10% em massa de um polímero orgânico com massa molar na faixa de 1 kDa a 400 kDa, selecionado do grupo consistindo de polietilenoimina,

poliarilamina polidicianodiamina, poli(ácido maleico), poli(ácido acrílico) e seus derivados;

d) 0,5% a 10% em massa de pelo menos um aditivo indutor de transição de fase selecionado do grupo consistindo de ésteres de cadeia média ou longa, ácidos graxos, aminas graxas, glicolipídios, fosfolipídios ou éteres de cadeia média ou longa;

e) 0,1% a 2% em massa de pelo menos uma nanozima inorgânica, selecionada do grupo consistindo de nanopartículas de cério, ferro, platina e manganês.

4. Processo de obtenção de um cubossoma, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado por** compreender as etapas de:

i) Misturar uma fase orgânica compreendendo pelo menos um lipídio polar na concentração de 0,1% a 4,0% (m/v) e pelo menos um polímero orgânico na concentração de 0,02% a 0,2% (m/v) com uma fase aquosa compreendendo pelo menos um surfactante na concentração de 0,2% a 0,01% (m/v), em que a proporção volumétrica de fase orgânica:aquosa é de 1:9 a 7:9, e os solventes são miscíveis em todas as proporções;

ii) Remover o solvente orgânico.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** compreender na fase orgânica pelo menos um aditivo indutor de transição de fase na concentração de 0,01% a 0,10% (m/v).

6. Processo, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, **caracterizado por** compreender uma etapa de:

iii) Complexar um precursor de nanozima com o polímero orgânico da região interna do cubossoma, seguido de síntese *in situ* da nanozima na região interna.

7. Cubossoma **caracterizado por** ser obtido por um processo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 4 a 6.

8. Composição farmacêutica **caracterizada por** compreender um excipiente farmacêuticamente aceitável e um cubossoma conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 7.

9. Uso de um cubossoma, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 7, **caracterizado por** ser para preparar um medicamento para tratar doenças do sistema nervoso central, esclerose múltipla, câncer e/ou infecções bacterianas.

10. Uso de um cubossoma, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 7, **caracterizado por** ser para análise de substratos.

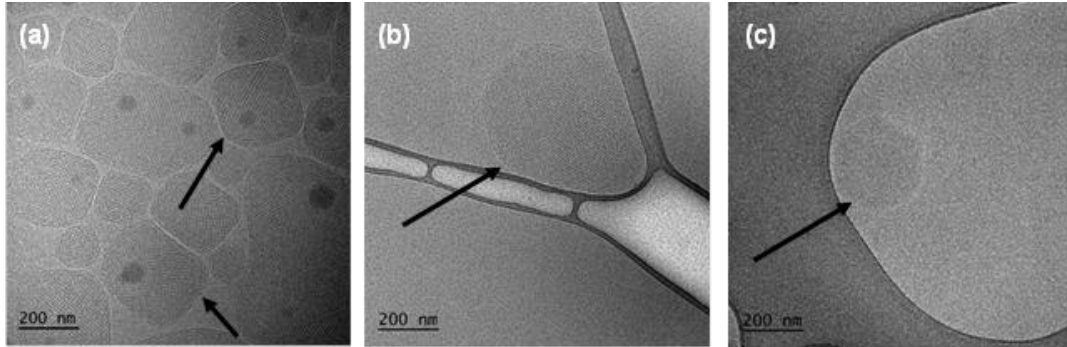
FIGURAS

Figura 1

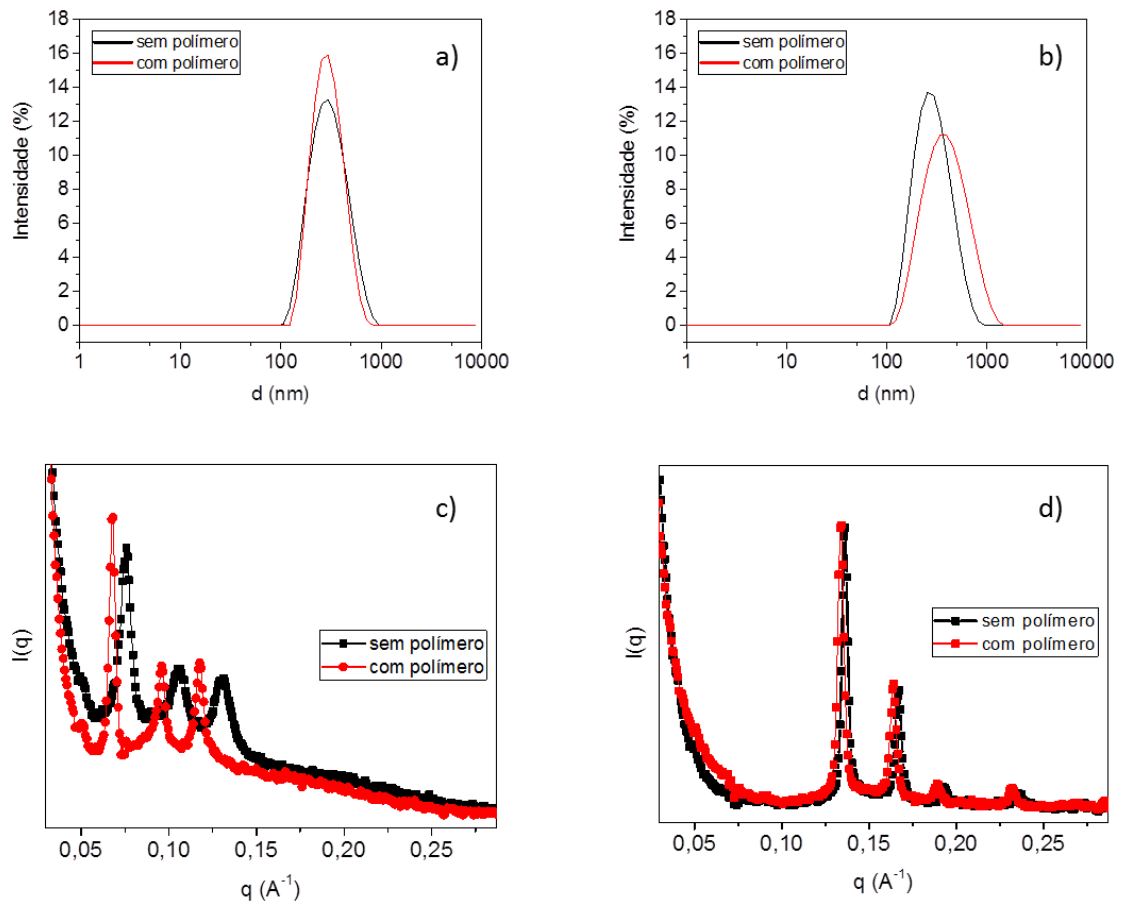


Figura 2

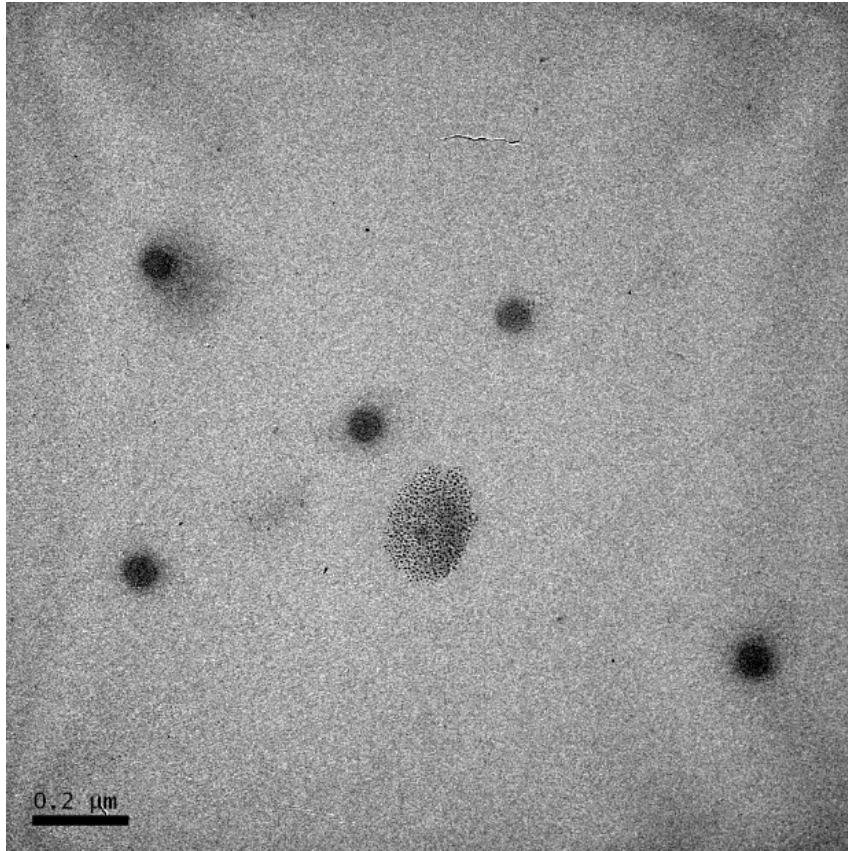


Figura 3

Resumo**CUBOSSOMA, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEUS USOS**

A presente invenção descreve um cubossoma lipídico com um núcleo polimérico, e opcionalmente compreende nanozimas em seu interior. Especificamente, a presente invenção compreende um processo de obtenção de nanopartículas poliméricas encapsuladas em cubossomas e os usos desses sistemas. A presente invenção se situa nos campos da Química, Farmácia, Engenharia de Materiais e Nanotecnologia.