



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

(11) PI 0705630-3 B1



(22) Data do Depósito: 12/12/2007

(45) Data de Concessão: 24/09/2020

(54) Título: CONFIGURAÇÃO LIPOSSOMAL FUNCIONAL E PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CONFIGURAÇÃO LIPOSSOMAL FUNCIONAL

(51) Int.Cl.: A61K 9/127; C12N 15/64.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) Inventor(es): LUCIMARA GAZIOLA DE LA TORRE; MARIA HELENA ANDRADE SANTANA; ROGÉRIO SILVA ROSADA; ARLETE A.M. COELHO CASTELO; CÉLIO LOPES SILVA.

(57) Resumo: CONFIGURAÇÃO LIPOSSOMAL FUNCIONAL E PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CONFIGURAÇÃO LIPOSSOMAL FUNCIONAL A invenção apresenta um produto para terapia e vacinação, constituído de uma configuração lipossomal funcional contendo polinucleotídeos complexados preferencialmente na superfície externa de lipossomas do tipo DRV's, e o seu processo de produção. Essa configuração lipossomal funcional contendo polinucleotídeos possui propriedades de mucoadesão que permite a administração através de vias não invasivas como a via nasal, e é capaz de carrear eficientemente os polinucleotídeos até o interior das células, liberando-os no citoplasma. Essas propriedades potencializam maior eficiência de ação in vivo dos polinucleotídeos carregados, redução da concentração e frequência de doses, e, no caso da vacinação produz proteção contra a doença específica

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**CONFIGURAÇÃO LIPOSSOMAL FUNCIONAL E PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CONFIGURAÇÃO LIPOSSOMAL FUNCIONAL**"

09

5 A presente invenção se refere ao produto funcional bem como ao processo de obtenção de uma composição lipossomal carreadora de polinucleotídeos para terapia e vacinação. Essa configuração lipossomal incorporando polinucleotídeos é mais eficaz tanto em relação aos polinucleotídeos livres quanto carreados em outras configurações lipossomais. É também economicamente viável, passível de uso clínico e veterinário pelas várias vias de administração, é estável quando estocada sob refrigeração e a sua
10 produção permite o aumento de escala para aplicação no setor industrial.

Descrição do estado da técnica

Lipossomas ou vesículas de fosfolipídios são agregados lamelares de bicamadas lipídicas, alternadas por um ou mais domínios aquosos internos, formando partículas aproximadamente esféricas com diâmetros da ordem de nanômetros a dezenas de micra.
15 Esses agregados são capazes de incorporar ou encapsular na sua matriz compostos carregados ou neutros de diferentes naturezas tais como hidrofílicos, que se posicionam nos domínios aquosos internos, lipofílicos nas bicamadas e anfifílicos entre ambos os domínios. As lamelas atuam como membranas que protegem os compostos carreados das agressões do meio ao qual estão expostos e promovem a sua liberação sustentada.
20 Alguns ativos quando expostos ao oxigênio do ar, à luz, ao calor ou à ação de meios biológicos, estão sujeitos à oxidação e/ou decomposição ou desnaturação, perdendo sua atividade. A incorporação e/ou encapsulação desses ativos em lipossomas contorna as limitações de estabilidade físico-química e biológica.

A proteção do meio biológico e a liberação sustentada dos bioativos carreados em
25 lipossomas aumentam a sua eficiência de ação e permitem que a dose e a frequência de administração sejam reduzidos. Em consequência disso, há também redução na toxicidade e efeitos colaterais dos bioativos em comparação às suas formas livres. Adicionalmente, a proteção também é necessária para que seja possível a comercialização e utilização segura desses produtos.

30 Os lipossomas pertencem à classe das nano e microcápsulas que têm sido aplicadas com sucesso para a incorporação e/ou encapsulação de compostos ativos de naturezas diversas, tais como aromas, enzimas, produtos cosméticos e fármacos, dentre outros. Em geral os lipossomas são biodegradáveis, atóxicos e não imunogênicos.

A incorporação refere-se à dispersão do composto ativo em toda a matriz de nano ou micropartículas (interior e superfície) e a encapsulação ao seu confinamento somente no interior da estrutura. Nano ou microcápsulas referem-se à partículas com diâmetros na faixa de nanômetros (10^{-9} m) ou micrômetros (10^{-6} m), respectivamente, e que possuem dois domínios distintos compostos de pelo menos um núcleo aquoso envolvido por uma matriz de material estrutural tal como lipídios, polímeros, etc. e suas blendas. Os compostos ativos podem estar interiorizados (encapsulados no(s) núcleo(s) aquoso (s) ou incorporados na matriz estrutural) ou localizados na superfície e/ ou nas regiões mais externas das nano ou microcápsulas. A configuração lipossomal é definida pelo posicionamento dos compostos ativos na sua matriz estrutural. Polinucleotídeos são cadeias de nucleotídeos que em dupla fita constituem os ácidos nucléicos DNA (ácido desoxirribonucléico) e RNA (ácido ribonucléico).

Comparados a outros sistemas de liberação sustentada tais como géis e matrizes poliméricas, os lipossomas permitem uma melhor interação com células por mimetizá-las em estrutura e composição. Dependendo da composição, os lipossomas podem também atuar como carreadores funcionais direcionando os compostos para órgãos alvos e/ou espaços intracelulares específicos, exercendo função co-adjuvante. No caso dos ácidos nucléicos RNA e DNA os alvos específicos são o citoplasma e o núcleo respectivamente.

O transporte efetivo de DNA para o interior das células só foi atingido com a sua associação a lipídios catiônicos em mecanismo denominado lipofecção (FELGNER, P.L.; GADEK, T.R.; HOLM, M.; ROMAN, R.; CHAM, H.W.; WENZ, M.; NORTHROP, J.P.; RINGOLD, G.M.; DANIELSEN, M. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 84, p. 7413-7417, 1987). Nesse contexto, lipídios catiônicos foram usados para carrear o DNA por meio de simples complexação eletrostática e facilitar o seu transporte para o interior das células, por possuírem carga oposta. Esse fato deu início a várias frentes de pesquisa, focando aspectos tais como o desenvolvimento de novos lipídios catiônicos e o desenvolvimento de vacinas gênicas. Dentre os documentos que descrevem esses desenvolvimentos pode-se citar: (LASIC, D.D., Boca Raton-Florida: CRC Press, 1997). Os primeiros estudos foram feitos com o lipídio catiônico estearilamina, porém não prosseguiram devido à sua toxicidade (FRANLEY, R; PAPAHAJOPOULOS, D., Current topics in microbiology and immunology, v. 96, pp. 171-191, 1981). Atualmente vários outros lipídios catiônicos sintéticos de menor toxicidade têm sido usados, dentre os quais os mais conhecidos como carreadores de ácidos nucléicos são os sais quaternários de amônio tais como o brometo de dimetildioctadecil amônio (DDAB), 1,2-dioleoil -3-trimetilamônio-propano

(DOTAP) e o 1,2-diácil-3dimetilamônio-propano (DOTAP) (LASIC, D.D., Boca Raton-Florida: CRC Press, 1997).

No processo de transporte para o interior das células, os polinucleotídeos associados à lipossomas catiônicos são inicialmente internalizados preferencialmente através do mecanismo de endocitose. Em uma segunda etapa é necessário que os polinucleotídeos sejam liberados da membrana endossomal para o citoplasma, possivelmente por ruptura da membrana que se desestabiliza devido à interações entre os lipídios catiônicos e suas moléculas aniônicas (WATTIAUX, R.; JADOT, M.; WARNIER-PIRROTTE, M.T.; WATTIAUX-DE CONINCK, S., FEBS Letters, v. 417, p. 199-202, 1997; ZHOU, X., HUANG, L., Biochimica et Biophysica Acta, v. 1189, p. 195-203, 1994). A desestabilização da membrana endossomal resulta em um "flip-flop" de seus lipídios aniônicos, predominantemente presentes na monocamada que interfaceia o citoplasma. Os lipídios aniônicos difundem-se para o complexo lipídio catiônico/nucleotídeo e formam com os lipídios catiônicos pares de íons com carga neutra, deslocando os nucleotídeos e liberando-os para o citoplasma (XU, Y.; SZOKA, F.C.J., Biochemistry, v. 35, p. 5616-5623, 1996). Dentro desse mecanismo, a presença de fosfatidoletanolaminas (PEs), também designadas como "helpers", intensificam o processo de liberação por possuírem características fusogênicas, que facilitam a desestabilização da membrana endossomal (FELGNER, J.H.; KUMAR, R.; SRIDHAR, C.N.; WHEELER, C.J.; TSAI, Y.J.; BORDER, R.; MARTIN, M.; FELGNER, P.L., Journal of Biological Chemistry, v. 269, p. 2550-2561, 1994; ZABNER, J.; FASBENDER, A.J.; MONINGER, T.; POELLINGER, K.A.; WELSH, M., Journal of Biological Chemistry, v. 270, p. 18997-19007, 1995; FARHOOD, H.; SERBINA, N.; HUANG, L., Biochimica et Biophysica Acta, v.1235, p.289-295, 1995).

Porém, a fusão dos lipídios associados ao DNA com a membrana endossomal provocada pelas PEs não ocorre diretamente com a membrana citoplasmática, sendo necessária a etapa inicial da endocitose (WROBEL, I.; COLLINS, D., Biochimica et Biophysica Acta, v. 1235, p. 296-304, 1995). Por essa razão as PEs são também designadas na literatura como co-lipídios em relação aos lipídios catiônicos.

Dentre as PEs, a ação fusogênica do 1,2 dioleoil- sn-glicero-3-fosfo etanolamina (DOPE) é mais conhecida. A importância do DOPE nos estudos de potencialização da liberação dos nucleotídeos "in vitro" com lipídios catiônicos, deve-se à sua capacidade de passar para a fase hexagonal HII, facilitando a desestabilização da membrana endossomal e promovendo a liberação dos polinucleotídeos no citoplasma através da troca de lipídios similares do endossoma com a membrana lipossomal conforme ilustrado

para o DNA na Figura 1. O DNA liberado deve ainda ser internalizado no núcleo para definir a expressão gênica de proteínas. O RNA realiza suas funções no próprio citoplasma celular.

A maioria dos trabalhos da literatura foca a simples complexação eletrostática do DNA com sistemas lipídicos binários compostos por lipídios catiônicos e lipídios "helper" como reportados nos documentos US5552157, US7105574, WO0024428, WO200045849-A2.

Vários kits para transfecção de DNA "in vitro", constituídos de lipídios catiônicos em sistemas binários com PEs são disponíveis comercialmente. Exemplos típicos são: "Lipofectin" (DOTMA/DOPE), "Lipofectamine" (DOSPA/DOPE) e "Lipofectace" (DODAB/DOPE), nos quais DOTMA é o cloreto de dioleoxi propil trimetil amônio e DOSPA é o lipídio 2,3 Dioleoiloxi-N-[(esperminacarboxamino)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio e DODAB é o brometo de dioctadecil dimetilamônio. Essas estruturas binárias compostas de lipídios catiônicos e DOPE são denominadas de lipoplexos (WASAN, E. K.; HARVIE P.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G.; BALLY, M. B., *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1461, p. 27-46, 1999). No entanto, existem vários trabalhos na literatura que as denominam de lipossomas simplesmente por apresentarem bicamadas lipídicas.

Um parâmetro muito importante para caracterização da complexação eletrostática entre polinucleotídeos e lipídios catiônicos, é a razão molar entre cargas ($R+/-$) estabelecida por (RÄDLER, J.O.; KOLTOVER, I.; JAMIELSON, A.; SALDITT, T.; SAFINYA, C.R., *Langmuir*, v.14, p. 4272-4283, 1998). Esse parâmetro relaciona o número de moles de cargas positivas, provenientes das cabeças polares carregadas positivamente dos lipídios catiônicos, e o número de moles de cargas negativas dos grupamentos fosfato presentes no esqueleto da molécula dos polinucleotídeos.

Em geral, a geometria molecular dos anfifílicos catiônicos e do DOPE, por si só não favorece a agregação em bicamadas lamelares nas condições fisiológicas. Os agregados formados são instáveis, havendo co-existência entre as fases lamelares e hexagonal (RÄDLER, J.O.; KOLTOVER, I.; SALDITT, T.; SAFINYA, C.R., *Science*, v. 275, p. 810-814, 1997), com o DNA intercalado nas estruturas (Figura 2). A associação de lipídios catiônicos e DOPE com fosfolipídios estruturais tais como fosfatidilcolinas (PCs), é imprescindível para a formação de lipossomas, os quais são constituídos de bicamadas regulares ou lamelas que se agregam intercalando domínios aquosos e gerando partículas coloidais aproximadamente esféricas.

13

Avaliações de vários fosfolipídios como carreadores de DNA na resposta imunológica "in vivo", reportadas na literatura (TOMLINSON, E.; ROLLAND, A.P., *Journal of Controlled Release*, v. 39, p. 357-372, 1996; FARHOOD, H.; SERBINA, N.; HUANG, L., *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1235, p.289-295, 1995; FELGNER, J.H.; KUMAR, R.; SRIDHAR, C.N.; WHEELER, C.J.; TSAI, Y.J.; BORDER, R.; MARTIN, M.; FELGNER, P.L., *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 2550-2561, 1994; WROBEL, I.; COLLINS, D., *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1235, p. 296-304, 1995), revelaram que a presença de DOPE ou PC/PE como fosfolipídios neutros é importante para a potencialização da resposta imunológica. No entanto, a associação com PCs de elevada temperatura de transição de fases (T_c) como é o caso da distearoilfosfatidilcolina (DSPC), diminui a eficiência transfecção, por tornar a bicamada mais rígida (menos fluida), reduzindo a sua interação com a membrana endossomal. A existência de uma correlação direta entre fluidez da bicamada e atividade de transfecção foi estudada por (DUZGUNES, N.; GOLDSTEIN, J.A.; FRIEND, D.S.; FELGNER, P.L. *Biochemistry*, v. 28, p. 9179-9184, 1989). Portanto, as PCs devem ter temperatura de transição de fases baixa, tal como a fosfatidilcolina natural de ovo (EPC), para que na temperatura corpórea os lipídios da membrana lipossomal estejam no estado líquido cristalino, conferindo-lhe a fluidez necessária para facilitar a ação do DOPE e DOTAP no transporte dos polinucleotídeos para o interior das células.

Do exposto pode-se concluir que formulações lipossomais estáveis, capazes de transportar polinucleotídeos para o interior das células devem formar sistemas ternários contendo componentes lipídicos funcionais:

(i) Lipídios estruturais, que garantem a agregação lipossomal das bicamadas. Um representante típico desta categoria, com baixa T_c é a L- α -Fosfatidilcolina de ovo (EPC) de origem natural, composta por uma mistura de fosfolipídios com ácidos graxos variados, de cadeias saturadas nas proporções 16:0 (34%) e 18:0 (11%) e insaturadas de 16:1 (2%), 18:1 (32%), 18:2 (18%), 20:4 (3%), onde as maiores proporções são do ácido graxo saturado com 16 átomos de carbono (16:0) e mono-insaturado com 18 átomos de carbono (18:1).

(ii) Lipídios com característica catiônica para complexação com os nucleotídeos, tais como o monocatiônico 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP).

(iii) Lipídios "helpers" ou co-lipídios, tal como o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

14

Os sistemas ternários de estrutura lipossomal contendo polinucleotídeos podem ser preparados por simples incubação para complexação eletrostática, semelhante ao sistemas binários, porém a internalização dos polinucleotídeos na estrutura lipossomal é dificultada pelo seu tamanho molecular. Lipossomas com alta eficiência de encapsulação de DNA, entre 88 e 97%, foram desenvolvidas por (PERRIE, Y.; GREGORIADIS, G., Biochimica et Biophysica Acta, v. 1475, p. 125-132, 2000), através do método da desidratação-rehidratação (KIRBY, C.; GREGORIADIS, G., Biotechnology, v. 2, p. 979-984, 1984). Nesse método, lipossomas previamente preparados (hidratados), foram desidratados através de liofilização e em seguida rehidratados. Durante a rehidratação os lipossomas se fundem formando novas estruturas lipossomais, chamadas de DRV ("dehydrated-rehydrated vesicles"). Nessa etapa, o DNA que foi juntamente liofilizado, intercala-se nos domínios aquosos entre as lamelas da estrutura DRV, formando uma configuração lipossomal com o DNA encapsulado, designada pela abreviação DRV(DNA). A utilização de DNA radiomarcado demonstrou a sua localização nos espaços interlamelares de lipossomas com diâmetro de aproximadamente 1 µm.

Esses trabalhos reportam ainda que os níveis de encapsulação do DNA na configuração DRV(DNA) não foram influenciados pelas quantidades de lipídios catiônico e neutro. Porém, o aumento da proporção de lipídio catiônico, resultou em lipossomas de menor diâmetro, devido à repulsão mútua das superfícies carregadas, desfavorecendo a fusão durante o processo de desidratação-hidratação. A configuração DRV(DNA), composta pelos lipídios EPC/DOPE/DOTAP encapsulando o plasmídeo pRc/CMV HBS, que codifica a expressão de antígeno para hepatite B, apresentou melhor resposta imunológica, quando comparado ao DNA nu (PERRIE, Y.; FREDERIK, P.M.; GREGORIADIS, G. Li., Vaccine, v. 19, p. 3301-3310, 2001). A composição molar ótima de EPC/DOPE/DOTAP foi 16:8:4, para 10 µg de DNA, em 2 mL de formulação lipossomal com razão molar de cargas foi (R+/- 20), gerando uma dosagem de 5 µg de pDNA para cada 100 µL de solução lipossomal. Os resultados foram obtidos através da imunização de camundongos Bab/c pela rota intramuscular entre 2 e 4 aplicações. A eficiência de ação do DNA encapsulado foi atribuída à proteção exercida pelos lipídios sobre o DNA encapsulado, preservando-o da degradação das nucleases e do ataque de moléculas aniônicas que poderiam agir competitivamente deslocando o DNA da superfície dos lipossomas ou dos lipoplexos (GREGORIADIS, G.; SAFFIE, R.; HART, S.L., Journal of Drug Targeting, v. 3, p. 469-475, 1996; PERRIE, Y.; GREGORIADIS, G. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1475, p. 125-132, 2000). Esses trabalhos deram origem ao documento WO9810748 e a desenvolvimentos subseqüentes envolvendo a

administração de lipossomas catiônicos pela via oral, encapsulando DNA na configuração DRV(DNA) (US7008791).

Uma configuração lipossomal alternativa, designada como DRV-DNA, foi obtida através da complexação do DNA com lipossomas DRVs vazias, produzindo partículas com diâmetros que variaram entre 4-20 μm (PERRIE, Y.; GREGORIADIS, G. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1475, p. 125-132, 2000). Porém, o elevado tamanho, 4 μm ou maiores, e a heterogeneidade dos lipossomas na configuração DRV-DNA, levaram os autores a descartá-los das suas pesquisas.

Como visto, os trabalhos desenvolvidos compreendem a produção de estruturas lipídicas binárias (lipoplexos) e ternária (lipossomas) encapsulando DNA e RNA. Estruturas lipossomais do tipo DRVs encapsularam DNA com alta eficiência produzindo configuração lipossomal do tipo DRV(DNA) com diâmetro da ordem de 1 μm , cuja transfecção foi caracterizada "in vivo". Os trabalhos descritos, no entanto, deixam a desejar quanto à produção e aos efeitos biológicos da configuração lipossomal DRV-DNA de tamanho reduzido (1-2 μm). Além disso as DRVs contendo DNA em ambas as configurações DRV(DNA) ou DRV-DNA, foram produzidas somente com razão de cargas entre lipídio catiônico e DNA, (R+/-), igual a 20 ou maior. Os efeitos profilático e/ou terapêutico dessas configurações não foram investigados com redução da dose em relação ao DNA nu, nem em função da via de administração. Medicamentos à base de polinucleotídeos possuem benefícios reconhecidos para a saúde humana e alto valor agregado. Portanto, o aumento da sua eficiência de ação se torna necessário.

A referida invenção tem como objetivo a apresentação de uma configuração lipossomal funcional DRV-DNA incorporando polinucleotídeos que fornece maior eficácia de ação tanto em relação aos polinucleotídeos livres quanto carregados em outras configurações lipossomais até então conhecidas e utilizadas na administração de ácidos nucléicos. A invenção também apresenta um método de obtenção desta configuração lipossomal que, através do emprego de parâmetros específicos, possibilita a formação de uma configuração lipossomal DRV-DNA apresentando tamanho reduzido e baixa polidispersidade, fatores importantes quando da utilização destas configurações em vacinas gênicas.

Breve Descrição da Invenção:

A presente invenção descreve uma configuração lipossomal funcional incorporando polinucleotídeo bem como um processo de produção dessa configuração. A configuração lipossomal a que se refere essa invenção compreende:

(a) um sistema ternário de lipídios composto por lipídio catiônico, lipídio estrutural e lipídio coadjuvante e,

(b) um polinucleotídeo.

16

5 A invenção se refere, ainda, a um processo para a obtenção da configuração lipossomal funcional compreendendo as seguintes etapas:

a) obtenção de lipossomas lamelares a partir de uma mistura contendo lipídio catiônico, lipídio estrutural e lipídio coadjuvante.

b) liofilização ou secagem dos lipossomas vazios

c) obtenção de vesículas desidratadas-rehidratadas (DRVs)

10 d) complexação de um polinucleotídeo com as DRVs através da mistura de DRVs com polinucleotídeos na proporção de 1,1 a 50 moles de cargas positivas dos lipídeos catiônicos para 1 mol de carga negativa do polinucleotídeo.

15 A invenção em questão também se refere a processos de obtenção de configuração lipossomal funcional que incluam o processo descrito nesta invenção e a composições farmacêuticas contendo configuração lipossomal como àquela descrita na invenção.

A invenção se refere, ainda a uma configuração lipossomal definida na invenção obtida de acordo com processo definido na invenção.

Breve Descrição das Figuras

20 A seguir, faz-se referência às Figuras que acompanham este relatório descritivo, para melhor entendimento e ilustração do mesmo, onde se vê:

25 A Figura 1 ilustra o mecanismo de liberação do DNA do complexo DNA/lipossoma catiônico ETAPA 1: Endocitose do complexo lipossoma catiônico/DNA. ETAPA 2: "Flip-flop" dos lipídios aniônicos presentes na membrana endossomal desestabilizam o endossoma. ETAPA 3: Formação de pares iônicos neutros entre lipídios catiônicos e aniônicos. ETAPA 4: Difusão do DNA para o citoplasma (Adaptado de Xu & Szoka, 1996).

A Figura 2 ilustra o equilíbrio entre as fases lamelar L_{α}^C e hexagonal inversa H_{II}^C dos lipoplexos (Adaptado de Rädler, 1997).

30 A Figura 3 ilustra comparativamente as etapas para a preparação da configuração DRV-DNA em comparação com a configuração DRV(DNA) e a configuração binária de lipoplexo. Os lipossomas multilamelares foram produzidos por hidratação de um filme

seco de lipídios; a redução e homogeneização de tamanhos feita por extrusão; a secagem dos lipossomas feita por liofilização. Para a configuração DRV(DNA) o DNA foi liofilizado juntamente com as DRVs vazias, posteriormente rehidratadas. Para a configuração DRV-DNA as DRVs vazias foram primeiro rehidratadas e depois complexadas com o DNA. Para os lipoplexos a complexação foi feita após a obtenção dos agregados lipídicos (lipossomas multilamelares).

A Figura 4 mostra a microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas do tipo DRV vazios (PC/DOPE/DOTAP 50:25:25% molar em solução salina). As barras indicam A) 1000 nm, B) 100nm.

A Figura 5 mostra a microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas do tipo DRV complexados com DNA, configuração DRV-DNA, em razão de cargas ($R_{+/-}$) 10 (PC/DOPE/DOTAP 50:25:25% molar em solução salina). As barras indicam A) 400 nm, B) 200nm, C) 200 nm, D) 40 nm.

A Figura 6 mostra a microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas do tipo DRV encapsulando DNA, configuração DRV(DNA) em razão de cargas ($R_{+/-}$) 10 (PC/DOPE/DOTAP 50:25:25% molar em solução salina). As barras indicam A) 1000 nm, B) 200nm, C) 100 nm, D) 100 nm.

A Figura 7 mostra microscopia eletrônica de transmissão de agregados lipídicos, composição binária (DOPE/DOTAP 50:50% molar em solução salina). Barras indicam A) 400 nm, B) 100nm.

A Figura 8 mostra microscopia eletrônica de transmissão de lipoplexos (agregados lipídicos complexados com DNA em razão de cargas $R_{+/-}$ 10) (DOPE/DOTAP 50:50% molar em solução salina). As barras indicam A) 400 nm, B) 200nm, C) 200 nm, D) 40 nm.

A Figura 9 mostra a distribuição de tamanhos dos lipossomas catiônicos compostos por PC/DOPE/DOTAP (50/25/25% molar) nas várias etapas de processamento para formação das estruturas DRVs. A) Após a hidratação do filme seco com água padrão para injeção. B) Lipossomas extrudados em membranas de policarbonato de poro com diâmetro nominal de 100 nm. C) Lipossomas vazios produzidos pelo método DRV em solução salina (NaCl 0,9%). D) Lipossomas produzidos pelo método DRV encapsulando DNA, configuração DRV(DNA) a uma razão de cargas 10, em solução salina (NaCl 0,9%). Cada gráfico apresenta a distribuição de tamanhos de três amostras independentes. E) Lipossomas vazios produzidos pelo método DRV e

complexados com DNA, configuração DRV-DNA, a uma razão de cargas 10, em solução salina (NaCl 0,9%).

18

A Figura 10 mostra eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do plasmídeo pVAX-hsp65 em estruturas lipídicas do tipo DRV(DNA), DRV-DNA e lipoplexos em razão de cargas ($R_{+/-}$) 10 em solução salina (NaCl 0,9%). O plasmídeo foi separado de cada preparação lipídica através da adição de solvente orgânico (clorofórmio/metanol 9:1 v/v), purificado com etanol e digerido com enzima de restrição Bam HI. Plasmídeos padrão e extraído foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%. Cada linha representa: M) Marcador de 1Kb; 1) DNA separado de lipoplexos; DNA separado de 2) DRV-DNA, 3) DRV(DNA) 4) DNA padrão.

A Figura 11 mostra a eletroforese em gel de agarose para várias estruturas lipídicas catiônicas obtidas em solução salina (NaCl 0,9%) e complexadas com DNA durante 10 minutos à temperatura ambiente, em várias razões de cargas ($R_{+/-}$): A) Complexos Lipossomas extrudados-DNA (LEs-DNA) compostos por PC/DOPE/DOTAP 50/25/25% (molar). Cada linha representa: 1) DNA (pVAXhsp65); 2) $R_{+/-}$ 0,5; 3) $R_{+/-}$ 1,0; 4) $R_{+/-}$ 1,5; 5) $R_{+/-}$ 2,0; 6) $R_{+/-}$ 2,5; 7) $R_{+/-}$ 3,0; 8) $R_{+/-}$ 3,5; 9) $R_{+/-}$ 4,0; 10) $R_{+/-}$ 4,5. B) Lipoplexos (Agregados lipídicos-DNA compostos por DOPE/DOTAP 50/50% (molar). Cada linha representa: 1) DNA (pVAXhsp65); 2) $R_{+/-}$ 0,5; 3) $R_{+/-}$ 1,0; 4) $R_{+/-}$ 1,5; 5) $R_{+/-}$ 2,0; 6) $R_{+/-}$ 2,5; 7) $R_{+/-}$ 3,0; 8) $R_{+/-}$ 3,5; 9) $R_{+/-}$ 4,0; 10) $R_{+/-}$ 4,5. C) DRV-DNA (Lipossomas DRV-DNA) compostos por PC/DOPE/DOTAP 50/25/25% (molar). Cada linha representa: 1) DNA (pVAXhsp65); 2) $R_{+/-}$ 0,5; 3) $R_{+/-}$ 1,0; 4) $R_{+/-}$ 1,5; 5) $R_{+/-}$ 2,0; 6) $R_{+/-}$ 2,5; 7) $R_{+/-}$ 3,0; 8) $R_{+/-}$ 3,5; 9) $R_{+/-}$ 4,0; 10) $R_{+/-}$ 4,5. comparativamente as eletroforeses com a razão de cargas, ($R_{+/-}$), mínima para a complexação de todo o DNA o DNA plasmídeoal pVax hsp65 em lipossomas extrudados (LEs) (A) , lipoplexos (B) e DRVs (C).

A Figura 12 mostra o termograma comparativo entre as várias estruturas lipídicas. As composições lipídicas são: (i) DRV vazio, PC/DOPE/DOTAP 50/25/25 % molar. (ii) DRV(DNA) e DRV-DNA, PC/DOPE/DOTAP 50/25/25 % molar, $R_{+/-}$ 10. (iii) Agregado lipídico, DOPE/DOTAP 50/50 % molar, $R_{+/-}$ 10. (iv) Lipoplexo, DOPE/DOTAP 50/50 %molar, $R_{+/-}$ 10. Taxa de aquecimento de 10°C/minuto. acessibilidade de sonda fluorescente ao DNA plasmídeoal pVax hsp65 incorporado na configuração DRV-DNA em comparação com os lipoplexos e DNA nu.

A Figura 13 mostra os perfis de decaimento de intensidade de fluorescência da sonda PicoGreen (% do inicial – referente ao DNA livre) em função de $R_{+/-}$ para as estruturas DRV-DNA (-■-)(EPC/DOPE/DOTAP, 50:25:25 % molar) e Lipoplexos (-●-)(DOPE/DOTAP, 50:50 % molar) para complexações realizadas em várias razões de

carga, em água ultra pura (Milli-Q). As amostras foram excitadas em comprimento de onda de 480 nm. Os espectros de calorimetria exploratória de varredura da configuração DRV-DNA em comparação com os espectros das configurações de mesma composição contendo do DNA encapsulado DRV(DNA) e lipoplexos.

- 5 A Figura 14 mostra o perfil de variação da distribuição de tamanhos e diâmetro hidrodinâmico das estruturas lipídicas ao longo da estocagem sob refrigeração. A) DRV vazio; B) DRV encapsulando DNA [DRV(DNA)]; C) DRV complexando DNA [DRV-DNA]; D) Agregados lipídicos; E) Lipoplexos.

- 10 A Figura 15 mostra o ensaio de citotoxicidade *in vitro* em macrófagos J774 através do emprego de metodologia baseada na redução do Brometo de tiazolil - (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio - Sal de tetrazólio MTT para as diferentes construções lipídicas vazias, contendo o plasmídeo pVAX-hsp 65 ou contendo somente o vetor comercial pVAX comparativamente os níveis de toxicidade das formulações lipídicas de mesma composição incorporando o DNA plasmídeo pVax hsp65 nas
- 15 diferentes configurações.

- A Figura 16 mostra a detecção da mensagem para hsp65 *in vitro* utilizando o RT-PCR. Macrófagos da linhagem J774 foram transfectados com as diferentes formulações lipossomais durante 72 horas e extraído o seu RNA total. A presença de mensagem nessas células foi detectada por RT-PCR utilizando-se os *primers* específicos para
- 20 hsp65. A qualidade do cDNA utilizado foi checada pela ampliação da β -actina. A amplificação das amostras tratadas com DNase I está indentificada por DNase (-), o que indica se ainda há ou não DNA nessas amostras tratadas. Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (1 %) e as bandas visualizadas por coloração com brometo de etídio. pb: pares de bases

- 25 A Figura 17 mostra a comparação entre a recuperação de bacilos viáveis do pulmão de animais vacinados com diferentes doses, configurações e rotas e desafiados com *M. tuberculosis* (Mtb). Camundongos BALB/c foram imunizados com uma dose de 50 μ g de DNA Hsp65 ou 2 doses de 50 μ g de DNA Hsp65 por via intramuscular, ou com uma dose de 25 μ g de DNA Hsp65 por instilação intranasal. Grupos controles foram
- 30 administrados com o vetor veiculado ou não, ou com o lipossoma vazio. Após 30 dias da administração, os camundongos foram desafiados com 10^5 bacilos de *M. tuberculosis* pela via intratraqueal. Trinta dias após o desafio, os animais foram mortos e os seus pulmões extraídos para a recuperação das unidades formadoras de colônia. Os resultados são representados em $\log_{10} \pm$ desvio padrão do CFU/g de cada grupo. A
- 35 diferença estatística foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ em relação ao Mtb.

Descrição Detalhada da Invenção

A invenção apresenta um produto para terapia e vacinação, constituído de uma configuração lipossomal funcional contendo polinucleotídeos complexados preferencialmente na superfície externa de lipossomas do tipo DRVs, e o seu processo de produção. Essa configuração lipossomal funcional contendo polinucleotídeos possui propriedades de mucoadesão que permite a administração através de vias não invasivas como a via nasal, e é capaz de carrear eficientemente os polinucleotídeos até o interior das células, liberando-os no citoplasma. Essas propriedades potencializam maior eficiência de ação *in vivo* dos polinucleotídeos carregados, redução da concentração e frequência de doses, e, no caso da vacinação produz proteção contra a doença específica.

20

21

A presente invenção se refere a uma configuração lipossomal carreadora de polinucleotídeos bem como ao processo de obtenção dessa configuração lipossomal carreadora de polinucleotídeos para terapia e vacinação. A presente invenção trata de polinucleotídeos com atividade profilática e/ou terapêutica, incorporados em carreador de natureza lipossomal formando uma configuração funcional, biologicamente mais estável em relação aos polinucleotídeos livres e com maior eficácia de ação tanto em relação aos polinucleotídeos livres quanto carreados em outras configurações lipossomais. Os lipossomas presentes na configuração da presente invenção contêm lipídios com funcionalidades estrutural, de incorporação do DNA e atração eletrostática com a superfície das células e de intensificação da liberação do DNA no citoplasma celular. Estes lipossomas são preparados pelo método da desidratação e rehidratação sob condições específicas definidas na invenção, na qual obtém-se inicialmente os lipossomas pré-formados, sendo então desidratados através da liofilização e em seguida rehidratados em condições controladas. Os polinucleotídeos são associados aos lipossomas localizando-se preferencialmente na sua superfície, através de uma complexação eletrostática em condições de agitação e temperatura rigorosamente controlados de modo a gerar partículas com tamanhos da ordem de nanômetros até 1-2 micrômetros e baixa polidispersidade. Nesta formulação denominada DRV-DNA, todos os polinucleotídeos encontram-se complexados ao sistema lipossomal em uma razão molar específica de cargas entre o nucleotídeo e o lipídio catiônico. Essa configuração é passível de uso clínico e veterinário, pelas várias vias de administração, é estável quando estocada sob refrigeração e a sua produção permite o aumento de escala para aplicação no setor industrial.

A configuração lipossomal da presente invenção garante uma maior eficiência de internalização do DNA ou polinucleotídeos nas células, resultando em maior eficiência de ação de formulação lipossomal com muito menor dose, produzindo os efeitos profiláticos e terapêuticos. Além disso essa configuração lipossomal não é citotóxica mesmo a altas concentrações, possui alta capacidade de carregamento de polinucleotídeos e é constituída de partículas de tamanhos da ordem de nanômetros até 1-2 micrômetros com baixa polidispersidade e propriedades mucoadesivas, de modo a poderem ser administradas por via mucosal não invasiva como a via nasal. Além disso, a configuração da presente invenção é reprodutível e é economicamente viável para produção industrial. Uma construção plasmidial de atividade profilática e terapêutica comprovada, quando carregada nessas partículas é capaz de produzir efeito profilático e terapêutico.

Atualmente, a entrega de polinucleotídeos no interior de células a partir de uma estrutura lipídica é realizada em muitos casos com o emprego de agregados lipídicos, lipoplexos, sistemas binários que possuem somente dois lipídios funcionais em sua estrutura (lipídio catiônico, que permite complexação eletrostática com o nucleotídeo e entrada no interior das células e co-lipídio, facilitador de liberação do nucleotídeo no interior celular). Estas estruturas, existentes no mercado, são na maioria das vezes instáveis, formam simultaneamente duas estruturas organizadas nas fases hexagonal inversa e lamelar conferindo maior instabilidade nas formulações, e dependendo da concentração são também citotóxicas, o que limita o carregamento de maior quantidade de DNA. Geralmente são usadas para ensaios "in vitro". Portanto não há formulações de vacinas gênicas ou terapias gênicas no mercado que atuem eficientemente in vivo e sejam estáveis e reprodutíveis de modo a permitir a comercialização segura.

Nos últimos 10 anos, um lipídio de ação estrutural foi adicionado à formulação binária, constituindo um sistema ternário de natureza lipossomal. O método de produção promove uma distribuição uniforme do nucleotídeo ao longo da estrutura lipossomal, pois os polinucleotídeos são encapsulados nos lipossomas pelo método convencional da desidratação rehidratação. No entanto, formulações desse tipo ainda não se encontram comercializadas. Configurações lipossomais como a da presente invenção, não citotóxica, com alta capacidade de carregamento e com tamanho de partículas da ordem de nanômetros até 2 micrômetros não são encontradas nem na literatura nem no mercado.

A configuração lipossomal da presente invenção apresenta diâmetro máximo de 2 micrômetros e compreende:

(a) um sistema ternário de lipídios composto por lipídio catiônico, lipídio estrutural e lipídio coadjuvante e,

(b) um polinucleotídeo.

O sistema ternário de lipídios da configuração lipossomal da invenção compreende a proporção molar de 20% a 30% de lipídio catiônico, 40% a 60% de lipídio estrutural e 20% a 30% de lipídio coadjuvante. Preferencialmente, o sistema ternário de lipídios da configuração lipossomal da invenção compreende a proporção molar de 25% de lipídio catiônico, 50% lipídio estrutural e 25% de lipídio coadjuvante.

O lipídio catiônico presente na configuração lipossomal da invenção é selecionado dentre 1,2-Dimyristoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-Dipalmitoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-Distearoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-

Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-Diacyl-3-Dimethylammonium-Propane; DC-CholesterolHCl; Dimethyldioctadecylammonium Bromide; 1,2-Dilauroyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,Ndimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate; N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-n,n,n-trimethylammonium chloride e 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-L-Serine]. Preferencialmente, o lipídio catiônico presente na configuração lipossomal da invenção é o 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane.

O lipídio estrutural é selecionado dentre lipídios sintéticos com cadeias de ácidos graxos assimétricas, lipídios sintéticos com cadeias de ácidos graxos simétricas saturadas, lipídios sintéticos com cadeias de ácidos graxos simétricas insaturadas e lipídios naturais. O lipídio sintético com cadeias de ácidos graxos assimétricas é selecionado dentre 1-Myristoyl-2-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Myristoyl-2-Stearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Myristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Stearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Docosahexaenoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Myristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Linoleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Arachidonoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Docosahexaenoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Oleoyl-2-Myristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Oleoyl-2-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Oleoyl-2-Stearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine. O lipídio sintético com cadeias de ácidos graxos simétricas saturadas é selecionado dentre 1,2-Diacyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine onde os grupos acyl possuem número de carbonos variando entre C₃ a C₂₄. O lipídio sintético com cadeias de ácidos graxos simétricas insaturadas é selecionado dentre 1,2-Diacyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine onde os grupos acyl possuem número de carbonos:insaturações variando entre C14:1 a C24:1, C18:2 a C18:3, C20:4 ou C22:6. O lipídio natural é selecionado dentre fosfatidilcolina de soja ou fosfatidilcolina de ovo. Preferencialmente, o lipídio natural é a fosfatidilcolina de ovo.

O lipídio coadjuvante da configuração lipossomal da invenção é selecionado dentre colesterol e L-alpha-Dioleoyl Phosphatidylethanolamine. Preferencialmente, o

lipídio coadjuvante da configuração lipossomal da invenção é o L-alpha-Dioleoyl Phosphatidylethanolamine.

O polinucleotídeo presente na configuração lipossomal da presente invenção corresponde a uma estrutura de DNA e/ou RNA.

24

5 A invenção também se refere a um processo de obtenção de configuração lipossomal funcional compreendendo as seguintes etapas e parâmetros:

a) obtenção de lipossomas lamelares a partir de uma mistura contendo lipídio catiônico, lipídio estrutural e lipídio coadjuvante.

b) liofilização ou secagem dos lipossomas vazios

10 c) obtenção de vesículas desidratadas-rehidratadas (DRVs)

d) complexação de um polinucleotídeo com as DRVs através da mistura de DRVs com polinucleotídeos na proporção de 1,1 a 50 moles de cargas positivas dos lipídeos catiônicos para 1 mol de carga negativa do polinucleotídeo.

15 A obtenção de lipossomas multilamelares ocorre através de hidratação de uma mistura de lipídios. A hidratação da mistura de lipídios pode ocorrer, inicialmente, através da solubilização de lipídios em solvente orgânico, sendo, preferencialmente utilizado o clorofórmio como solvente orgânico. Promove-se, então, a evaporação do solvente orgânico para, em seguida, adicionar-se água sob agitação intensa, favorecendo, assim,
20 a formação de lipossomas hidratados multilamelares. Pode-se, alternativamente, hidratar uma mistura de lipídios através da adição direta de lipídios (em pó) em água sob agitação, sob condições controladas de temperatura e agitação com a utilização de um homogeneizador de alta pressão para dispersar os lipídios em meio aquoso. A mistura de lipídios que é hidratada de acordo com procedimento descrito anteriormente, compreende
25 lipídio catiônico, lipídio estrutural e lipídio coadjuvante.

O lipídio catiônico presente na mistura de lipídios que é hidratada é selecionado dentre 1,2-Dimyristoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-Dipalmitoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-Distearoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-Diacyl-3-Dimethylammonium-Propane; DC-
30 CholesterolHCl; Dimethyldioctadecylammonium Bromide; 1,2-Dilauroyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-

Ethylphosphocholine; 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,Ndimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate; N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-n,n,n-trimethylammonium chloride e 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-L-Serine]. Preferencialmente, o lipídio catiônico presente na configuração lipossomal da invenção é o 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane.

O lipídio estrutural presente na mistura de lipídios que é hidratada é selecionado dentre lipídios sintéticos com cadeias de ácidos graxos assimétricas, lipídios sintéticos com cadeias de ácidos graxos simétricas saturadas, lipídios sintéticos com cadeias de ácidos graxos simétricas insaturadas e lipídios naturais. O lipídio sintético com cadeias de ácidos graxos assimétricas é selecionado dentre 1-Myristoyl-2-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Myristoyl-2-Stearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Myristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Stearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Docosahexaenoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Myristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Linoleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Arachidonoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Docosahexaenoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Oleoyl-2-Myristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Oleoyl-2-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Oleoyl-2-Stearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine. O lipídio sintético com cadeias de ácidos graxos simétricas saturadas é selecionado dentre 1,2-Diacyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine onde os grupos acyl possuem número de carbonos variando entre C₃ a C₂₄. O lipídio sintético com cadeias de ácidos graxos simétricas insaturadas é selecionado dentre 1,2-Diacyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine onde os grupos acyl possuem número de carbonos:insaturações variando entre C14:1 a C24:1, C18:2 a C18:3, C20:4 ou C22:6. O lipídio natural é selecionado dentre fosfatidilcolina de soja ou fosfatidilcolina de ovo. Preferencialmente, o lipídio natural é a fosfatidilcolina de ovo.

O lipídio coadjuvante presente na mistura de lipídios que é hidratada é selecionado dentre colesterol e L-alpha-Dioleoyl Phosphatidylethanolamine. Preferencialmente, o lipídio coadjuvante presente na mistura é o L-alpha-Dioleoyl Phosphatidylethanolamine.

O processo de obtenção de configuração lipossomal funcional da presente invenção pode compreender, ainda, uma etapa de redução e homogeneização dos lipossomas após a obtenção dos mesmos na etapa a. A redução de tamanho dos

lipossomas ocorre através de etapa de extrusão, na qual os lipossomas devem atravessar membranas de policarbonato sobrepostas, com diâmetro nominal de 100 nm, sob pressão de nitrogênio em diversas passagens. Nessas condições ocorre a redução do tamanho destas partículas.

2C

- 5 A redução de tamanhos não se torna necessária quando os lipídios são hidratados através da adição direta dos lipídios (em pó) em água sob agitação, sob condições controladas de temperatura e agitação, ou com a utilização de um homogeneizador de alta pressão para dispersar os lipídios em meio aquoso.

- 10 A obtenção de vesículas desidratadas-rehidratadas (DRVs) na etapa c ocorre através de hidratação dos lipossomas vazios obtidos na etapa b sob agitação e temperatura de 0°C a 12 °C. Preferencialmente, a temperatura de hidratação dos lipossomas vazios é de 2°C a 5°C.

- 15 Na etapa d de obtenção da configuração lipossomal funcional da invenção, a concentração de lipídios (DRVs) a serem complexados com polinucleotídeo é de 0,02M a 0,2M. Preferencialmente, a concentração de lipídios a serem complexados com polinucleotídeo é de 0,05M a 0,1M. Ainda na etapa d, a mistura de DRVs com polinucleotídeos ocorre, preferencialmente, na proporção 5 a 15 moles de cargas positivas dos lipídeos catiônicos para 1 mol de carga negativa do polinucleotídeo. Ainda mais preferencialmente, a mistura de DRVs com polinucleotídeos ocorre na proporção 10
- 20 moles de cargas positivas dos lipídeos catiônicos para 1 mol de carga negativa do polinucleotídeo. A mistura de DRVs com polinucleotídeos na etapa d, ocorre à temperatura de 0°C a 12°C. Preferencialmente a a mistura de DRVs com polinucleotídeos ocorre à temperatura de 2°C a 5°C.

- 25 A invenção em questão se refere, ainda, a processos de obtenção de configuração lipossomal funcional que incluam o processo descrito nesta invenção e a composições farmacêuticas contendo configuração lipossomal como àquela descrita na invenção.

A invenção se refere, também, a uma configuração lipossomal definida na invenção obtida de acordo com processo definido na invenção.

- 30 Como exemplo da funcionalidade da presente invenção e para efeitos de comparação com outras configurações lipossomais, foi criada, de acordo com processo objetivo da presente invenção, e testada uma configuração lipossomal funcional contendo o composto bioativo plasmideal pVax hsp65, com ação vacinal e terapêutica, constituindo uma formulação atóxica, estável e reprodutível que será intitulada de DRV-DNA. Essa

construção plasmideal, carreadora do gene Hsp65 de *M. leprae*, possui ação profilática e terapêutica comprovada (Lowrie, D.B.; Tascon, R.E.; Colston, M.J.; Silva, C.L., *Vaccine*, v. 12, p. 1537-1540, 1994; Tascon, R.E.; Colston, M.J.; Ragno, S.; Stavropoulos, E.; Lowrie, D.B., *Nat. Med.*, v.2, p. 888-892, 1996; Lowrie, D.B.; Silva, C.L.; Tascon, R.E., *Springer Seminars in Immunopathology*, v. 19, p. 161-173, 1997; Bonato, V.L.D.; Lima, V.M.F.; Tascon, R.E.; Lowrie, D.B.; Silva, C.L., *Infect. Immun.*, v.66, p. 169-175, 1998; Lowrie, D.B.; Tascon, R.E.; Bonato, V.D.L.; Lima, V.M.F.; Faccioli, L.H.; Stavropoulos, E.; Colston, M.J.; Hewinson, R.G.; Moelling, K.; Silva, C.L., *Nature*, v. 400, p. 269-271, 1999). A seguir são apresentadas caracterizações que identificam propriedades físico-químicas e biológicas da configuração lipossomal funcional DRV-DNA contendo a construção plasmideal pVax hsp65.

O esquema da Figura 3 ilustra comparativamente as etapas para a preparação da configuração DRV-DNA em comparação com a configuração DRV(DNA) e a configuração binária de lipoplexo. O método de preparação é simples, composto de etapas passíveis de serem escalonadas para a produção comercial. O controle rígido das condições operacionais assegura a reprodutibilidade da configuração produzida.

Na configuração lipossomal DRV-DNA, como também nas outras configurações usadas para comparação, DRV(DNA) e lipoplexo, foi usada uma razão de cargas ($R_{+/-}$ 10), requerida para se atingir uma dosagem de DNA menor do que a anteriormente determinada para o DNA nu para terapia e vacinação (3 dosagens de 100µg). As formulações lipídicas contiveram concentração total de lipídios 256 mM, que produziram uma concentração total de 50 µg de DNA em 100 µL de preparação lipídios.

As Figuras 4 a 8 mostram as diferenças morfológicas entre as várias configurações lipossomais incorporando DNA plasmideal, através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (METs). Assim, as Figuras 4A e B, mostram a estrutura de DRV vazia, da configuração lipossomal funcional do tipo DRV-DNA com o DNA posicionado preferencialmente na superfície (Figuras 5A a D), em comparação com as configurações contendo do DNA encapsulado DRV(DNA) (Figuras 6A a D), agregados lipídicos (Figuras 7A e B) e lipoplexos (Figuras 8A a D).

Nas Figuras 4A e B que mostram as estruturas lipossomais vazias do tipo DRVs, pode-se observar morfologia aproximadamente esférica, apresentando certo grau de fusão e agregação, identificados pela presença de estruturas maiores e polidispersas. O processo de desidratação e rehidratação (DRV) apresenta, como principal limitação, a produção de lipossomas de elevado diâmetro e de população heterogênea, propiciando também a formação de lipossomas multilamelares (KIRBY, C.; GREGORIADIS, G.,

27

Biotechnology, v. 2, p. 979-984, 1984). A elevada polidispersidade pode ser constatada a partir da distribuição de tamanhos obtida através de espalhamento da luz ("quasi-elastic light scattering", QLS) (Figura 9C), onde duas populações são normalmente encontradas: uma menor de cerca de 175 nm e outra maior de cerca de 932 nm. A menor população pode estar relacionada às vesículas que não sofreram agregação ou fusão, enquanto a segunda população, de diâmetro maior, pode relacionar-se às estruturas coloidais maiores provenientes de fusões ou agregações.

As estruturas DRV-DNA apresentadas nas Figuras 5 (A a D), apresentam alterações na morfologia em relação aos DRV vazios, em decorrência da encapsulação do DNA na razão de cargas $R \pm 10$. Estruturas tubulares podem ser identificadas em regiões próximas da superfície lipossomal, sugerindo que o DNA esteja localizado nas regiões mais externas dos lipossomas (Figuras 5B, C e D). As imagens brancas que apareceram nestas microscopias, geradas por artefatos na preparação das amostras, não comprometeram a avaliação morfológica das estruturas. Razões de cargas maiores (menores quantidades de DNA), não são suficientes para alterar a morfologia dos DRVs como reportado por Perrie et al (2001) para lipossomas com $R \pm 20$. As diferenças estruturais observadas na Figuras 5 podem, também, ser identificadas a partir dos diâmetros hidrodinâmicos médios e distribuição de tamanhos (Tabela 1).

TABELA 1

Estrutura Lipídica	Diâmetros médios das populações (nm $\pm$ SD) (i)	
	População 1	População 2
Lipossomas compostos por EPC/DOPE/DOTAP 50/25/25% molar		
Lipossoma Hidratado	392 $\pm$ 75	1729 $\pm$ 398
Lipossoma Extrudado (LE)	136 $\pm$ 17	
DRV vazio	175 $\pm$ 11	932 $\pm$ 408
DRV(DNA)	227 $\pm$ 74	1036 $\pm$ 328
DRV-DNA	653,5 $\pm$ 204	2434 $\pm$ 596
Agregados compostos por DOPE/DOTAP 50/50% molar		
Agregados lipídicos	396,5 $\pm$ 49,1	1792,8 $\pm$ 333,6
Lipoplexos	593 $\pm$ 147,7	3110,4 $\pm$ 174

- (i) SD: Desvio padrão para número de amostras variando entre 3 e 4.

Os tamanhos variados das estruturas são resultantes de um rearranjo específico que ocorre após a agregação (contato) e subsequente mistura de lipídios entre vesículas (etapa intermediária) das membranas lipossomais, resultando na formação de uma nova bicamada. Estas interações facilitam o "cross-linking" das vesículas através de pontes de DNA, podendo levar a mudanças nas membranas lipossomais favorecendo fusões ou outras formas de desestabilização das bicamadas, como reportado por (WASAN, E. K.; HARVIE P.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G.; BALLY, M. B., *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1461, p. 27-46, 1999).

A diferença entre as morfologias encontradas para estruturas do tipo DRV(DNA) e DRV-DNA, Figuras 5 e 6, respectivamente, são significativas, especialmente na superfície externa dos lipossomas. Estruturas do tipo DRV(DNA) apresentam algumas irregularidades morfológicas (Figura 6 C), porém as estruturas DRV-DNA apresentam elevado grau de irregularidade (Figura 5 B, C e D), formando estruturas tortuosas em sua superfície. A comparação entre estas duas estruturas sugere que DRV(DNA) apresenta distribuição do DNA mais homogênea ao longo das bicamadas lipídicas, promovida pelo processo de encapsulação (desidratação e rehidratação controlada), enquanto DRV-DNA permite que o DNA localize-se nas superfícies mais externas. A localização mais externa do DNA permite que fusões e agregações entre vesículas ocorram mais facilmente, promovendo rupturas de bicamadas, formando assim as estruturas tubulares ou tortuosas apresentadas na Figura 5 D.

METs dos agregados lipídicos são apresentados na Figura 7. Pode-se identificar a presença de estruturas esféricas (Figura 7A), porém encontram-se também estruturas resultantes de fusões e agregações. A Figura 7B revela algumas estruturas com irregularidades em sua forma, quando comparado à morfologia de lipossomas do tipo DRV vazio (Figura 4A e 4B).

Wasan, E. K.; Harvie P.; Edwards, K.; Karlsson, G.; Bally, M. B. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1461, p. 27-46, 1999, obteve imagens através de microscopia eletrônica de crio-fratura em estruturas lipídicas de DODAC (dioleilydimethylammonium chloride)/DOPE (50/50% molar) em 150 mM de NaCl e constatou a instabilidade da bicamada, podendo até visualizar que parte da estrutura organiza-se na fase hexagonal inversa (Figura 2). A identificação desta instabilidade pode justificar o polimorfismo encontrado nas estruturas DOPE/DOTAP (50/50% molar) preparadas em 154 mM de NaCl e visualizadas através das microscopias (Figura 7A e 7B).

29

As microscopias de DRV's vazios e agregados lipídicos (Figuras 4 e 7, respectivamente) mostram que ambos os sistemas lipídicos apresentam-se altamente polidispersos. Por outro lado, a análise de distribuição de tamanhos obtida através de espalhamento dinâmico de luz (QLS) nos mostra que estas estruturas apresentam distribuição bimodal e também bastante polidispersa. A segunda população identificada na distribuição de tamanhos (Figura 9) pode ser provavelmente consequência de algumas fusões que ocorrem, conforme apresentado nas Figuras 4A e 4B para DRV's vazias e 7A e 7B para agregados lipídicos. Esses resultados mostram que a distribuição e empacotamento dos lipídios na estrutura lipossomal depende do método de preparação.

A característica polimórfica dos lipoplexos pode ser facilmente visualizada na Figura 8. Formas aleatórias podem ser identificadas (Figuras 8A e 8B), como também estruturas tubulares semelhantes às das estruturas do tipo DRV-DNA (Figura 8C e 8D).

Alterações morfológicas significativas também foram observadas por (Wasan, E. K.; Harvie P.; Edwards, K.; Karlsson, G.; Bally, M. B., *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1461, p. 27-46, 1999), identificando porém que a superfície era do tipo "impressão digital" ("finger print") para estruturas lipídicas formadas por DODAC/DOPE (50/50 % molar), porém em razão de cargas 1,6. Estruturas similares também foram encontradas por Gustafsson et al. (1995) e Šmisterová et al. (2001) em sistemas contendo DOPE/DOTAP e SAINT-2 (lipídios catiônicos derivatizados com pirimidina/DOPE 1:1), respectivamente. A presença destas "impressões digitais" foram encontradas somente em formulações contendo DOPE.

A comparação das microscopias para DRV-DNA e lipoplexos (Figuras 5 D e 7C) permite identificação de regiões que possuem morfologia similar às "impressões digitais" descritas. A estimativa das peridiocidades encontradas revela valores na faixa de 2,5 a 5,5 nm, de mesma ordem de grandeza que o estudo anteriormente citado, indicando que o mesmo tipo de empacotamento esteja ocorrendo nas regiões identificadas. Porém, a morfologia global encontrada nos DRV-DNA e lipoplexos não é a mesma encontrada por Wasan, E. K.; Harvie P.; Edwards, K.; Karlsson, G.; Bally, M. B. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1461, p. 27-46, 1999, sugerindo que diferenças de parâmetros de processo durante a complexação possam alterar a morfologia dos vários tipos de complexos.

A Figura 10 apresenta a eletroforese da configuração DRV-DNA em comparação com o DNA livre, mostrando a manutenção integridade do plasmídeo após a preparação. A configuração produzida, designada por DRV-DNA, possui ainda flexibilidade na razão molar de cargas (R+/-) em função da dose de DNA requerida, respeitando a razão de

cargas mínima, determinada experimentalmente, para a complexação total do DNA. Essa propriedade permite que a configuração lipossomal possa ser utilizada para outros DNA plasmídeos.

A razão de cargas ($R_{+/-}$) mínima para a complexação total do DNA depende da exposição do lipídio catiônico, e portanto caracteriza a configuração agregada. As eletroforeses da Figura 11 mostram comparativamente a razão de cargas, ($R_{+/-}$), mínima para complexação total do DNA na configuração DRV-DNA (A), em comparação com a configuração contendo o DNA encapsulado [DRV(DNA)] (B) e lipoplexos (C). Os valores obtidos de ($R_{+/-}$) são apresentados comparativamente na Tabela 2, para as várias configurações de DNA associado a DRVs, incluindo ainda a configuração resultante da associação do DNA com lipossomas extrudados (DNA-LE) (obtidos pelo método de Bangham e extrudados para homogeneização de tamanhos) e lipoplexos.

TABELA 2

Estrutura	$R_{+/-}$ que promove total incorporação de DNA
LE	1,5
Agregado lipídico	1,5
DRV vazio	4,0

A razão de cargas 1,5 identificada para a configuração DNA-LE foi a mesma encontrada para os agregados lipídicos formadores dos lipoplexos. Os lipossomas extrudados, com diâmetro médio de 136 nm e distribuição unimodal, devido ao seu tamanho permitem exposição de maior quantidade de cargas positivas, fazendo com que razões de carga 1,5 já promovam a incorporação total do DNA. No caso dos agregados lipídicos, apesar do maior tamanho (396,5 e 1792,8 nm), permite também que nesta razão de cargas ($R_{+/-}$ 1,5) todo o DNA já esteja complexado. Este comportamento mostra a instabilidade da estrutura lipídica contendo somente DOPE/DOTAP para complexar-se com o DNA.

Quando DRVs são utilizados para complexação com o DNA, verifica-se que a razão molar de cargas ($R_{+/-}$) necessária para promover a incorporação completa do DNA na configuração DRV-DNA é 4. Comparando este valor com o obtido para DNA-LE, que se diferencia somente no diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanhos, tem-se que, para estruturas que possuem o lipídio estrutural EPC, além do tamanho, a distribuição dos lipídios na estrutura lipossomal são fatores importantes da razão de cargas para incorporação do DNA. Através microscopia eletrônica e crio-fratura, Perrie,

Y.; Frederik, P.M.; Gregoriadis, G. Vaccine, v. 19, p. 3301-3310, 2001, teve um indicativo que as estruturas DRV's são multilamelares. Essa informação explica a razão de cargas mais elevada da configuração DRV-DNA em comparação com DRV-LE, pela presença de lipídio catiônico nas lamelas mais internas dos lipossomas, dificultando o contato inicial com o DNA e sua subsequente complexação. Como o EPC age de modo estrutural, estabilizando a agregação lipídica em bicamadas, torna-se mais difícil para o DNA complexar-se com os lipídios catiônicos presentes nas camadas mais internas.

Estruturas do tipo DRV(DNA) utilizando plasmídeo semelhante (pcDNA3-hsp65) em tampão TRIS-Edta demonstraram capacidade de incorporação de DNA em razões de carga de até 3,5.

A grande diferença entre a razão de cargas utilizada nas preparações lipídicas para os testes *in vitro* e *in vivo* deste exemplo ($R \pm 10$) e a razão na qual promove-se a incorporação completa do DNA (Tabela 2) identifica a grande flexibilidade do sistema para ajustes de concentração de DNA para atender aos requerimentos de dose conforme a aplicação.

As diferenças no empacotamento DNA/lipídios nas configurações lipossomais e nos lipoplexos, caracterizadas pela razão de cargas e observadas nas microscopias, refletem-se na carga superficial medida pela técnica do potencial zeta. Dependendo do grau de complexação, a configuração resultante apresenta carga superficial diferente. A Tabela 3 mostra comparativamente a carga superficial das formulações lipídicas de mesma composição incorporando o DNA plasmídeo pvax hsp65 nas configurações lipossomais (A e B) e nos lipoplexos (C).

TABELA 3

Estruturas Lipídicas	Potencial Zeta (mV $\pm$ SD) (i)
DRV vazio	+26,9 $\pm$ 2,4
DRV-DNA ($R \pm 10$)	+27,3 $\pm$ 2,3
DRV(DNA) ($R \pm 10$)	+32,8 $\pm$ 4,0
Agregado lipídico	+48,3 $\pm$ 3,2
Lipoplexo ($R \pm 10$)	+48,6 $\pm$ 2,5

(i) SD: Desvio padrão para 3 amostras.

(ii) Medidas utilizaram solução salina 0,9% como meio diluente

Todas as estruturas lipídicas produzidas em NaCl 0,9% são de característica catiônica pois apresentam valores de potencial zeta (ζ) positivos. A presença do lipídio estrutural EPC nos lipossomas DRV's promove diminuição significativa do valor do

potencial zeta, devido, provavelmente, à maior internalização dos lipídios que ocorre tanto pela sua agregação com o DOPE e DOTAP, quanto pela fusão após a rehidratação e complexação com o DNA. 33

No caso dos agregados lipídicos, os lipídios catiônicos tornam-se mais expostos na superfície coloidal, comparados aos DRV's.

A presença de DNA na razão de cargas ($R_{+/-}$) 10 não influencia significativamente na característica catiônica do DRV's e lipoplexos. Este fato indica que a superfície destes colóides mantém-se catiônica, com valores de densidade de carga na mesma ordem de grandeza quando o DNA é simplesmente complexado (DRV-DNA e lipoplexos) ou então incorporado [DRV(DNA)], sugerindo, que, juntamente com a avaliação eletroforética, que o DNA presente nestas estruturas está totalmente associado.

A técnica de calorimetria exploratória diferencial foi utilizada para avaliar a influência da composição lipídica e da presença do DNA na temperatura de transição de fase das diferentes estruturas lipídicas. A preparação das amostras consistiu de uma etapa prévia de liofilização e outra de acondicionamento em dessecador, sob vácuo e refrigeração. Os termogramas para as estruturas lipídicas vazias e com o DNA incorporado (Figura 12) permite a identificação das principais temperaturas de transição e os respectivos valores de entalpia, conforme apresentado na Tabela 4.

TABELA 4

Estruturas	Temperatura de transição de fases	ΔH (i)	ΔS (ii)
	(°C)	(cal/mol)	(cal/mol.K)
DRV vazio	12.97	2010	7,03
DRV(DNA), $R_{+/-}$ 10	12.87	2296	8,03
DRV-DNA, $R_{+/-}$ 10	14.41	3393	11,80
Agregados lipídicos	1.22	4485	16,36
Lipoplexo, $R_{+/-}$ 10	-2.41	2641	9,76

(iii) Variação de entalpia

(iv) Variação de entropia

34

As estruturas do tipo DRV (Figura 12) tiveram a transição de fases ocorrendo em maior faixa de temperatura, gerando bandas mais largas e de transição assimétrica quando comparado aos agregados lipídicos e lipoplexos, causados pela presença do EPC, que é de origem natural e que contém uma mistura de fosfolipídeos com ácidos graxos variados.

Os termogramas referentes aos agregados lipídicos e lipoplexos (Figura 12) que contêm apenas DOTAP e DOPE como lipídios em sua composição, apresentam pico mais definido, devido, provavelmente, à maior pureza, pois se tratam de lipídios sintéticos.

As temperaturas de transição de fases para DRV vazio e agregados lipídicos foram 12,97 e 1,22°C, respectivamente. Esta variação de temperatura de transição de fases ocorre devido às diferenças de composições lipídicas encontrada em cada estrutura, refletindo conseqüentemente em diferenças na forma de agregação de cada estrutura.

No caso dos agregados lipídicos, a temperatura de transição de fases tem a contribuição apenas dos lipídios DOPE e DOTAP, ambos em fração molar 0,5. No mesmo estudo realizado por KOLTOVER, I.; SALDITT, T.; RADLER, J.O.; SAFINYA, C.R. Science, v. 281, p. 78-81, 1998, formulações lipídicas nestas condições, em água, tendem a formar simultaneamente duas fases, a hexagonal inversa (H^c_{II}) e a lamelar (L^c_{α}). Desta forma, a temperatura de transição de fases pode estar relacionada à transição de fase líquido cristalino para hexagonal inversa ($L^c_{\alpha} \rightarrow H^c_{II}$).

A presença do EPC nas estruturas DRV vazia, permite maior interação hidrofóbica, gerando menor nível de variação de entalpia ($\Delta H = 2010$ cal/mol), enquanto, a presença somente de DOPE e DOTAP para os agregados lipídicos diminui estas interações, contribuindo para um maior nível de variação de entalpia ($\Delta H = 4485$ cal/mol). As variações de entropia (ΔS) para DRV vazio e agregados lipídicos foram 7,03 e 16,36 cal/mol.K, respectivamente. O maior valor de ΔS para os agregados lipídicos pode indicar maior desorganização desta estrutura, possivelmente pela presença organização lipídica na forma hexagonal inversa.

Para o DNA incorporado em estruturas [DRV(DNA)], o valor de T_m é 12,87°C, mantendo-se muito próximo ao valor da respectiva estrutura DRV vazia ($T_m = 12,97^\circ\text{C}$). Isto sugere que o DNA não está provocando grandes perturbações na organização da bicamada lipídica, indicando que o processo de desidratação e rehidratação, no qual ocorre fusão entre as vesículas, permite boa acomodação do DNA possivelmente na fase

aquosa entre as lamelas, em uma configuração do tipo sanduíche, como proposto por RÄDLER, J.O.; KOLTOVER, I.; SALDITT, T.; SAFINYA, C.R. Science, v. 275, p. 810-814, 1997.

35

Esta avaliação também é consistente com os valores de variação de entalpia e entropia, pois estes não sofrem alterações significativas, indicando que a presença do DNA não altera significativamente as interações hidrofóbicas e o nível de organização da bicamada.

A simples complexação do DNA com DRV's vazios gera estruturas do tipo DRV-DNA. Neste caso, observa-se um aumento de T_m para $14,41^\circ\text{C}$, sendo maior que a respectiva estrutura vazia ($T_m = 12,97^\circ\text{C}$) e o DRV(DNA) ($T_m = 12,87^\circ\text{C}$). Este mesmo comportamento de T_m também foi identificado por SUBRAMANIAN, M.; HOLOPAINEN, J. M.; PAUKKU, T.; ERIKSSON, O.; HUHTANIE, I.; KINNUNEN, P. K.J., Biochimica et Biophysica Acta, v. 1466, p. 289-305, 2000, em estudos de caracterização de lipossomas compostos por DMPC/BPDAB (95/5% molar), onde BPDAB refere-se a bis[2-(11-phenoxyundecanoate)ethyl]dimethylammonium bromide. Os autores identificaram que mesmo um pequeno aumento da concentração de DNA eleva a temperatura de transição de fases, também sugerindo que o DNA condensa o lipídio catiônico, formando domínios lipídicos ordenados que alteram T_m .

Os agregados lipídicos apresentam temperatura de transição de fases $1,22^\circ\text{C}$ (Tabela 4). Quando estas estruturas são complexadas com o DNA, a temperatura de transição de fases cai para $-2,41^\circ\text{C}$. Isto indica que a organização no empacotamento lipídico sofreu perturbações, diminuindo as interações de atração de van der Waals.

A acessibilidade de sonda fluorescente ao DNA caracteriza o seu posicionamento na configuração estrutural de lipídios. Os espectros de emissão de fluorescência do reagente PicoGreen após ligação com DNA dupla fita (dsDNA), DNA fita simples (ssDNA) e RNA estão ilustrados através da Figura 13, indicando a especificidade desta sonda ao DNA dupla fita. Esta sonda é específica para quantificação de DNA dupla fita (dsDNA), porém o mecanismo de ligação deste reagente ainda não é totalmente claro, ocorrendo possivelmente sua intercalação com o DNA (SINGER, V.L.; JONES, L.J.; YUE, S.T.; HAUGLAND, R.P., Analytical Biochemistry, v. 249, p. 228-238, 1997).

Quando esta sonda é utilizada em complexos lipídio catiônico/DNA, verifica-se que ocorre um decaimento de intensidade de fluorescência, que é dependente da razão de cargas. Este decaimento é causado pela barreira criada pelo lipídio catiônico e pela estrutura lipídica, diminuindo, desta forma, a acessibilidade da sonda ao DNA (TSAI, J.T.;

FURSTOSS, K.J.; MICHNIK, T.; SLOANE, D.L. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 36, p. 13-20, 2002.). Curvas de intensidade de fluorescência em função da razão de cargas podem ser construídas, permitindo a caracterização quanto a acessibilidade da sonda de DNA nas diferentes estruturas lipídicas. A fim de se minimizar a influência, da
5 composição do meio, utilizou-se água ultrapura (Milli-Q) como meio reacional de complexação.

36

Os perfis de decaimento de fluorescência emitida pela sonda PicoGreen nas estruturas do tipo DRV e agregado lipídico em função da razão de cargas em fluorescência (porcentagem do inicial) estão apresentados na Figuras 13. Inicialmente a
10 intensidade de fluorescência cai e atinge um valor constante a medida que se eleva a razão de cargas. Quando maiores teores de lipídio catiônico são empregados, a quantidade de DNA livre na solução tende a desaparecer, e conseqüentemente, diminui a quantidade de DNA acessível à sonda. Valores de $R_{+/-}$ maiores que 4 para DRV-DNA e 1,75 para lipoplexo já mantêm a intensidade de fluorescência absoluta praticamente
15 constante, indicando que razões de carga maiores não promovem mais influência, possivelmente por não haver mais DNA acessível na suspensão coloidal. Este valor de fluorescência "residual" é então característico de cada tipo de estrutura lipídica, podendo, neste ponto, identificar a intensidade de fluorescência (porcentagem do inicial) como a acessibilidade da sonda ao DNA. Os valores acessibilidade foram $37 \pm 8,7\%$ e 12% , para
20 DRV-DNA e lipoplexo, respectivamente. Isto indica que estruturas DRV-DNA permitem maior acesso do PicoGreen ao DNA. Por outro lado, como a complexação do DNA com o PicoGreen depende fortemente da presença da configuração em dupla fita do DNA, nesses ensaios a intensidade da fluorescência é uma função não só da quantidade de DNA, mas também da sua conformação (dupla fita ou fita única).

25 Apesar de não se ter realizado medida da fluorescência do lipoplexo e DRV-DNA em $R_{+/-} 10$, sabe-se que o valor da intensidade de fluorescência é praticamente igual ao encontrado para $R_{+/-} 1,75$ e 4, respectivamente, conforme verificado no comportamento da Figura 13 (região do patamar). Desta forma, a acessibilidade e o comportamento destas construções em $R_{+/-} 10$ é igual à identificada anteriormente.

30 A intensidade de fluorescência para a construção DRV(DNA) em $R_{+/-} 10$ (formulação utilizada para teste "in vivo") foi medida, viabilizando a identificação da acessibilidade, gerando valor de $27,6\%$. Esse valor é menor que o encontrado para o DRV-DNA (37%), possivelmente devido à distribuição mais uniforme existente nos DRV(DNA)s ocasionada pelo processo de desidratação e rehidratação. Esta diferença
35 sugere que somente efeitos difusivos estejam influenciando na intercalação da sonda ao

37

DNA, indicando que o DRV(DNA) possui o DNA mais internalizado em sua estrutura, enquanto o DRV-DNA possui o DNA presente na região mais externa, e que a configuração em dupla fita é mantida. As acessibilidades da sonda ao DNA contido em cada tipo de estrutura podem ser então relacionadas, organizando-as em ordem decrescente: DRV-DNA > DRV(DNA) > Lipoplexo. Este comportamento permite distinguir as diferenças entre os tipos de estruturas DRVs e agregados lipídicos. Os DRVs permitem maior acesso da sonda ao DNA possivelmente devido à sua maior organização em bicamada, enquanto os agregados lipídicos permitem interação molecular mais intensa, devido à menor estruturação lipídica (presença simultânea das formas lamelar e hexagonal inversa), dificultando difusão e a intercalação da sonda ao DNA.

A avaliação da estabilidade física das estruturas lipídicas contendo DNA e das respectivas estruturas "vazias" foi realizada a partir do monitoramento do diâmetro hidrodinâmico das diferentes populações ao longo de 70 dias de estocagem sob refrigeração, conforme apresentado na Figura 14.

A estrutura do tipo DRV vazio manteve-se praticamente constante ao longo de 60 dias de estocagem (Figura 14A) mantendo as duas populações (200 nm e 900 nm). Quando o DNA é encapsulado [DRV(DNA)], as duas principais populações são mantidas, embora a população de diâmetro hidrodinâmico maior tenha uma leve tendência a aumentar de tamanho (Figura 14B). Evidencia-se a presença de duas populações com diâmetros hidrodinâmicos da mesma ordem de grandeza que as respectivas populações encontradas para a estrutura vazia, porém com maior oscilação de tamanho para a população 2. Esta oscilação pode ser justificada pela alteração de morfologia (alteração de esfericidade, por exemplo) encontrada nas microscopias eletrônicas de transmissão (Figura 6) conferindo certa variação de leitura dos diâmetros no equipamento de espalhamento dinâmico de luz.

A estrutura DRV-DNA (Figura 14C), por sua vez, já apresenta uma maior tendência de agregação da maior população. A população de menor tamanho, com diâmetro médio próximo de 400 nm manteve-se relativamente estável. A população de maior tamanho manteve-se também estável durante 30 dias com certa tendência de agregação após 60 dias de estocagem.

Embora certa variação dos diâmetro hidrodinâmicos ocorram para as estruturas do tipo DRV, a variabilidade foi considerada aceitável, uma vez que o diâmetro hidrodinâmico máximo estabelecido pelo Centro de Pesquisas em Tuberculose é de 6 µm para a aplicação em vacinas.

38

A estocagem de agregados lipídicos sob refrigeração e conseqüente acompanhamento da distribuição de tamanhos e diâmetro hidrodinâmico pode ser visualizada na Figura 14D. Neste caso, pode-se verificar a menor estabilidade destas estruturas, através da presença inicial de três populações, inclusive com agregados da ordem de 12000 nm. Ao longo da estocagem, significativas alterações populacionais ocorrem, pois a partir do 15º dia de estocagem a menor população com diâmetro inicial de 100 nm desaparece e a terceira população inicia o decaimento de seu tamanho, enquanto a segunda população é a que permanece mais estável, sendo que o sistema apresenta-se altamente polidisperso durante todo o período avaliado.

O comportamento do diâmetro hidrodinâmico das populações dos lipoplexos está apresentado Figura 14E. Existe uma tendência na variação do diâmetro hidrodinâmico da maior população, indicando que próximo a 15 dias de estocagem esta população assume um tamanho mínimo por volta de 2000 nm para em seguida aumentar novamente. Além disso, após 35 dias de estocagem apareceram agregados que não se dispersavam com uma agitação manual, indicando que um estado irreversível de agregação estava se iniciando.

É interessante notar que todas as estruturas lipídicas catiônicas produziram uma população com diâmetro na faixa de 200 a 500 nm que se mantém relativamente estável ao longo do período de estocagem avaliado, independentemente da composição (presença ou ausência do lipídio estrutural) e método de incorporação do DNA (encapsulação ou complexação eletrostática).

As diferentes construções lipídicas foram avaliadas quanto à citotoxicidade in vitro em células de macrófagos da linhagem J774 através do emprego de metodologia baseada na redução do Brometo de tiazolil - (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio - Sal de tetrazólio MTT, realizado apenas pelas células vivas, a partir de método desenvolvido por DENIZOT, F.; LANG, R. Journal of Immunological Methods, v. 89, p. 271-277, 1986.

A Figura 15 apresenta as curvas de células viáveis relativas ao controle para as várias estruturas lipídicas [DRV vazio, DRV-DNA, DRV(DNA), agregado lipídico e lipoplexo] em presença do plasmídeo pVAX-hsp 65 ou somente do vetor comercial pVAX em várias concentrações. A abscissa deste gráfico possui 2 escalas diretamente relacionadas: a quantidade de DNA utilizada para os ensaios "in vitro", proporcional ao volume total de solução lipídica empregada. Estas escalas duplas são necessárias, pois a avaliação teve âmbito geral, incluindo o DNA nu (em quantidade proporcional ao utilizado nas formulações lipídicas) e formulações lipídicas contendo ou não DNA. Para estruturas

do tipo DRV ou apenas o DNA nu com dosagens de até 200 µg de DNA ou 400 µL de solução lipídica, 70% das células ainda permanecem viáveis, enquanto agregados lipídicos e lipoplexos apresentam menos que 50% das células viáveis para dosagem de 8,37 µg de DNA ou 17 µL de solução lipídica. Este comportamento indica elevada citotoxicidade destas estruturas lipídicas que não contém a fosfatidilcolina natural de ovo em sua formulação. É válido ressaltar que muitos ensaios de transfecção "in vitro" são realizados com estas estruturas, porém as concentrações lipídicas são bastante inferiores à proposta neste trabalho.

Através da transfecção "in vitro" em macrófagos da linhagem J774 foi possível identificar se o plasmídeo conseguiu atingir o núcleo celular e realizou a etapa de transcrição para que a síntese do RNA mensageiro (mRNA) que contém a codificação da proteína hsp 65 possa ocorrer. O método empregado, consistiu em realizar a incubação das estruturas lipídicas com as células de macrófagos, para em seguida realizar a extração do RNA total. Como é difícil a identificação do mRNA específico do hsp 65, utiliza-se uma enzima do tipo transcriptase reversa para a obtenção do cDNA (DNA complementar) total. Através da técnica de PCR, realizou-se a amplificação do cDNA específico para o hsp 65 ou β-actina (controle) para posterior identificação em eletroforese em gel de agarose. Como a β-actina é um elemento constitutivo das células eucarióticas, ela foi utilizada como um controle do processo.

As estruturas lipídicas contendo o plasmídeo pVAXhsp 65 ou apenas o vetor pVAX, além do plasmídeo e vetor nu, e excetuando-se agregados lipídicos e lipoplexos devido à sua citotoxicidade, foram avaliadas quanto a mensagem para hsp 65. Através da Figura 16, o controle para a β-actina foi positivo para todas as construções, indicando que o processo de obtenção do mRNA é possível. A presença de mRNA para hsp65 foi identificada apenas nas células que foram transfectadas com a estrutura DRV-DNA hsp65, sugerindo que essa construção apresenta uma eficácia maior de transfecção *in vitro*, quando comparada com as demais formulações utilizadas. A ausência de detecção de mensagem para a hsp65 com as demais formulações pode ser decorrente da baixa eficiência de transfecção, o que pode ser compensada por período de tempo maior de cultura "in vitro" para a detecção da mensagem para a hsp65. Através da caracterização dos DRV(DNA)s pode-se observar que estas estruturas são mais compactas, apresentando diâmetro médio populacional menor. Esta característica pode ter influenciado durante o processo de transfecção, necessitando-se possivelmente de tempo maior de incubação com os macrófagos para que esta estrutura permita que o DNA incorporado nas regiões mais internas seja liberado.

A detecção da mensagem para hsp65 também não foi observada para o complexo lipofectina e DNA nas condições recomendadas pelo fabricante. Uma das razões atribuídas a esse evento foi a presença de considerável quantidade de lise celular durante a transfecção com a formulação de lipofectina e DNA, o que pode ter concorrido para a degradação de RNAs mensageiros. Embora seja possível obter mensagem para β -actina dessas amostras, indicando que pelo menos parte do mRNA estava em boa qualidade, mensagens em menor frequência, como a da hsp65, podem ter sua detecção prejudicada nessa situação.

40

Curiosamente, da mesma forma que a lipofectina, também se verificou grande presença lise celular durante a transfecção para os macrófagos transfectados com agregados lipídicos e lipoplexos.

O efeito profilático da configuração DRV-DNA contendo a construção plasmideal pVAX-Hsp65 foi avaliado em comparação com a configuração DRV (DNA) e com o DNA nu pelas rotas intramuscular e nasal. Na análise dos resultados, a proteção foi definida como o abaixamento igual ou superior a 0,5 log do número de unidades formadoras de colônias (CFU) nos pulmões dos animais desafiados com o *M. tuberculosis*, mantendo-se a integridade do parênquima pulmonar. O protocolo experimental usado para a rota intramuscular contemplou a administração total de 300 μ g de DNA em 3 doses de 100 μ g, e de 50 μ g de DNA em dose única ou 100 μ g de DNA em 2 aplicações de 50 μ g.

A administração nasal das configurações lipossomais diferencia claramente as estruturas e demonstra a superioridade da configuração DRV-DNA, na proteção contra a tuberculose. A Figura 17 mostra o resultado em termos de contagem do número de unidades formadoras de colônias (CFU) nos pulmões dos animais desafiados com o *M. tuberculosis* quando foi aplicada somente 1 dose de 25 μ g de DNA.

REIVINDICAÇÕES

1. Configuração lipossomal funcional caracterizada pelo fato de que apresenta diâmetro máximo de 2 micrômetros e compreende:
- 5 a) um sistema ternário de lipídios composto por lipídio catiônico. Lipídio estrutural e lipídio coadjuvante e,
- b) um polinucleotídeo
2. Configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o sistema ternário de lipídios compreende a proporção molar de 20% a 30% de lipídio catiônico, 40% a 60% de lipídio estrutural e 20% a 30% de lipídio coadjuvante.
- 10 3. Configuração lipossomal funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2 caracterizada pelo fato de que o sistema ternário de lipídios compreende a proporção molar de 25% de lipídio catiônico, 50% lipídio estrutural e 25% de lipídio coadjuvante.
- 15 4. Configuração lipossomal funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 caracterizada pelo fato de que o lipídio catiônico é selecionado dentre 1,2-Dimyristoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-Dipalmitoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-Distearoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane; 1,2-Diacyl-3-Dimethylammonium-Propane; DC-CholesterolHCl; Dimethyldioctadecylammonium Bromide; 1,2-Dilauroyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Distearoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Ethylphosphocholine; 2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,Ndimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate; N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-n,n,n-trimethylammonium chloride e 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-L-Serine]
- 20 5. Configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 4 caracterizado pelo fato de que o lipídio catiônico é 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane.
- 30 6. Configuração lipossomal funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 caracterizada pelo fato de que o lipídio estrutural é selecionado dentre lipídios sintéticos com cadeias de ácidos graxos assimétricas, lipídios sintéticos

com cadeias de ácidos graxos simétricas saturadas, lipídios sintéticos com cadeias de ácidos graxos simétricas insaturadas e lipídios naturais.

7. Configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 6 caracterizado pelo fato de que o lipídio sintético com cadeias de ácidos graxos assimétricas é selecionado dentre 1-Myristoyl-2-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Myristoyl-2-Stearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Myristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Stearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Palmitoyl-2-Docosahexaenoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Myristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Linoleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Arachidonoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Stearoyl-2-Docosahexaenoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Oleoyl-2-Myristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Oleoyl-2-Palmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine; 1-Oleoyl-2-Stearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine.

8. Configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 6 caracterizado pelo fato de que o lipídio sintético com cadeias de ácidos graxos simétricas saturadas é selecionado dentre 1,2-Diacyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine onde os grupos acyl possuem número de carbonos variando entre C₃ a C₂₄.

9. Configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 6 caracterizado pelo fato de que o lipídio sintético com cadeias de ácidos graxos simétricas insaturadas é selecionado dentre 1,2-Diacyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine onde os grupos acyl possuem número de carbonos:insaturações variando entre C14:1 a C24:1, C18:2 a C18:3, C20:4 ou C22:6.

10. Configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 6 caracterizado pelo fato de que o lipídio natural é selecionado dentre fosfatidilcolina de soja ou fosfatidilcolina de ovo.

11. Configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 10 caracterizado pelo fato de que o lipídio natural é a fosfatidilcolina de ovo.

12. Configuração lipossomal funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 caracterizado pelo fato de que os lipídios coadjuvantes são selecionados dentre colesterol e L-alpha-Dioleoyl Phosphatidylethanolamine.

42

13. Configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 12 caracterizado pelo fato de que o lipídio coadjuvante é o L-alpha-Dioleoyl Phosphatidylethanolamine.

43

14. Configuração lipossomal funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13 caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo corresponde a uma estrutura de DNA e/ou RNA.

15. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

e) obtenção de lipossomas lamelares a partir de uma mistura contendo lipídio catiônico, lipídio estrutural e lipídio coadjuvante.

f) liofilização ou secagem dos lipossomas vazios

g) obtenção de vesículas desidratadas-rehidratadas (DRVs)

h) complexação de um polinucleotídeo com as DRVs através da mistura de DRVs com polinucleotídeos na proporção de 1,1 a 50 moles de cargas positivas dos lipídeos catiônicos para 1 mol de carga negativa do polinucleotídeo.

16. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a obtenção de lipossomas multilamelares na etapa a ocorre a partir da hidratação de uma mistura de lipídios.

17. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a mistura de lipídios compreende lipídio catiônico, lipídio estrutural e lipídio coadjuvante.

18. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, caracterizado pelo fato de que compreende, ainda, uma etapa de redução e homogeneização dos lipossomas após a obtenção dos mesmos na etapa a.

19. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18 caracterizado pelo fato de que a obtenção de vesículas desidratadas-rehidratadas (DRVs) na etapa c ocorre através de hidratação dos lipossomas vazios obtidos na etapa b sob agitação e temperatura de 0°C a 12 °C.

20. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 19 caracterizado pelo fato de que a temperatura de hidratação dos lipossomas vazios é de 2°C a 5°C.

44

21. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 20 caracterizado pelo fato de que a concentração de lipídios a serem complexados com polinucleotídeo é de 0,02M a 0,2M.

22. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 21 caracterizado pelo fato de que a concentração de lipídios a serem complexados com polinucleotídeo é de 0,05M a 0,1M.

23. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 22 caracterizado pelo fato de que na etapa d, a mistura de DRVs com polinucleotídeos ocorre na proporção 5 a 15 moles de cargas positivas dos lipídeos catiônicos para 1 mol de carga negativa do polinucleotídeo.

24. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 23 caracterizado pelo fato de que a mistura de DRVs com polinucleotídeos ocorre na proporção 10 moles de cargas positivas dos lipídeos catiônicos para 1 mol de carga negativa do polinucleotídeo.

25. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 24 caracterizado pelo fato de que na etapa d, a mistura de DRVs com polinucleotídeos ocorre à temperatura de 0°C a 12°C.

26. Processo de obtenção de configuração lipossomal funcional de acordo com reivindicação 25 caracterizado pelo fato de que a mistura de DRVs com polinucleotídeos ocorre à temperatura de 2°C a 5°C.

27. Processo de obtenção de configuração lipossomal caracterizado pelo fato de que compreende processo definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 26.

28. Configuração lipossomal funcional conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 15 caracterizada pelo fato de que é obtida de acordo com processo definido em qualquer uma das reivindicações 16 a 27.

29. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende configuração lipossomal funcional conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

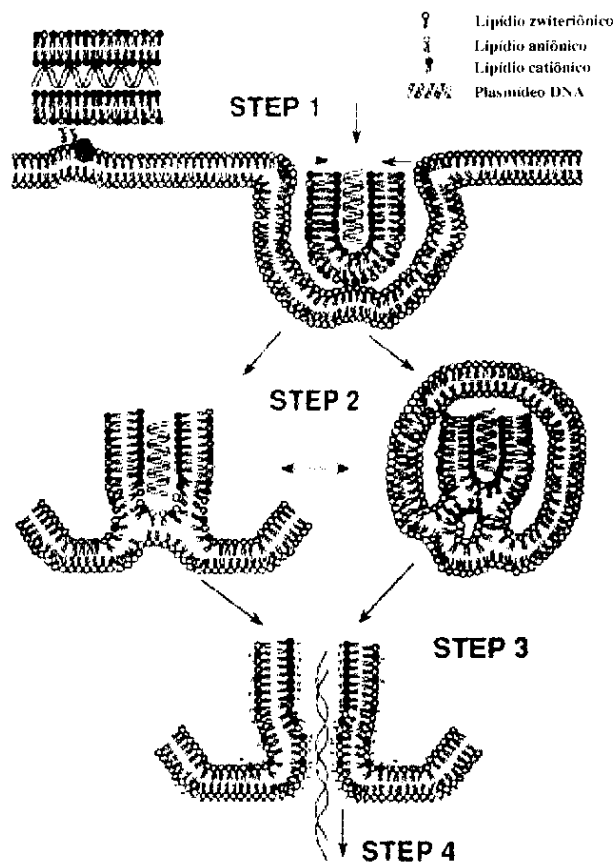


FIGURA 1

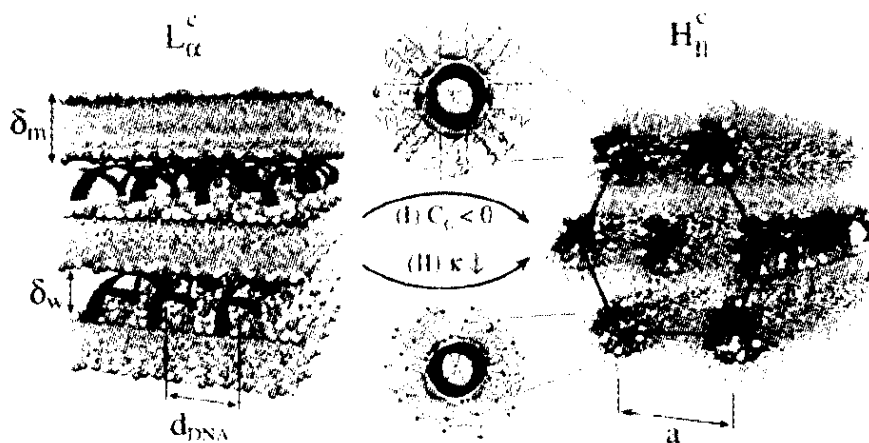


FIGURA 2

46

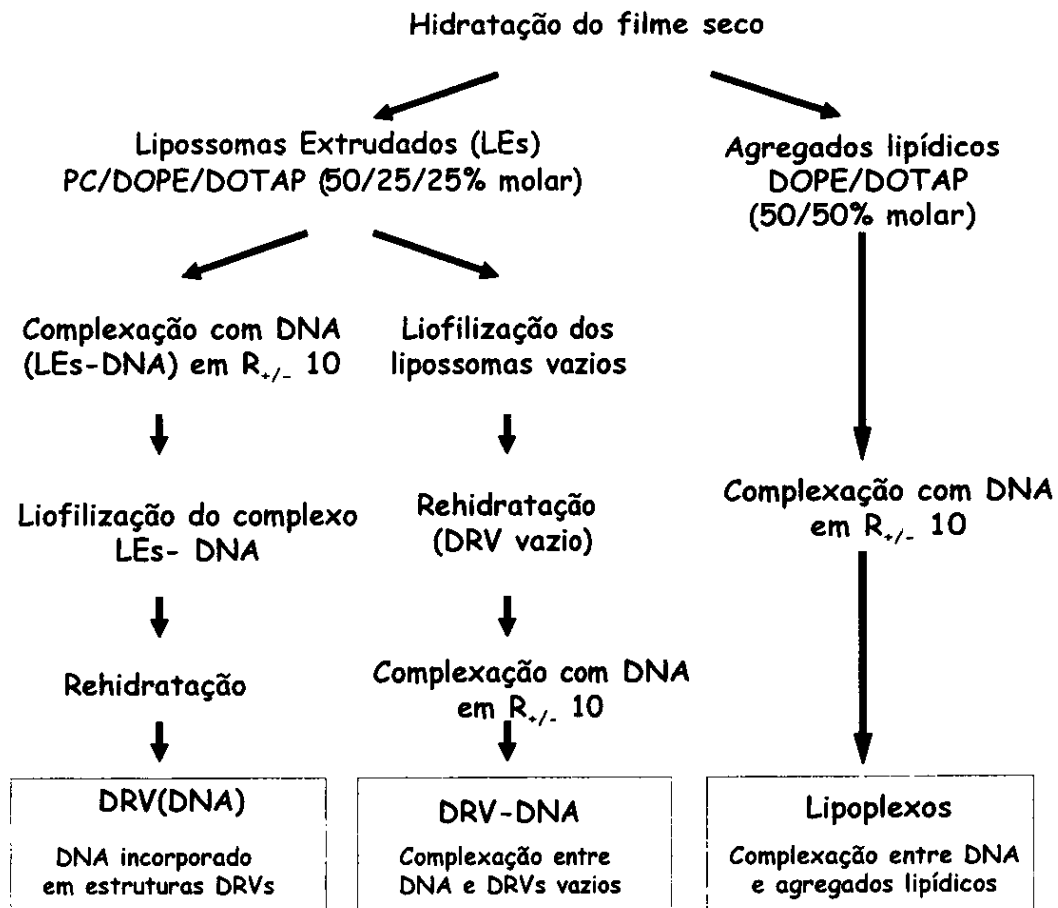
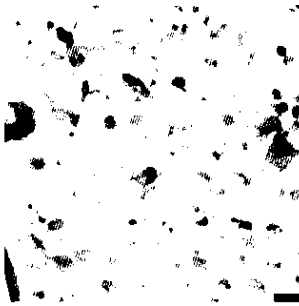


FIGURA 3

47

A



B)

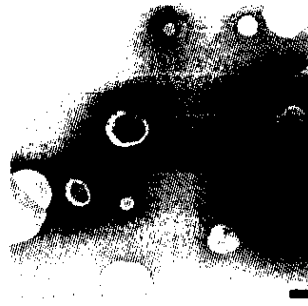


FIGURA 4

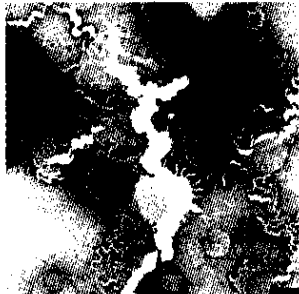
A)



B)



C)



D)

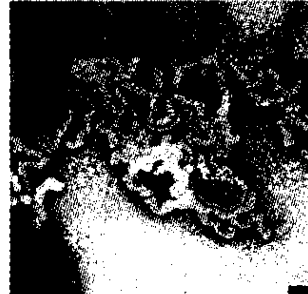
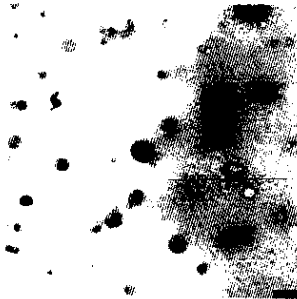


FIGURA 5

48

A)



B)



C)

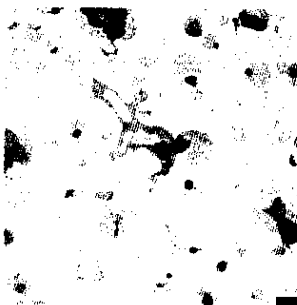


D)



FIGURA 6

A)



B)

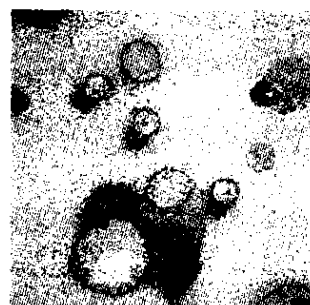
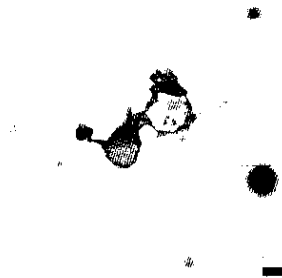


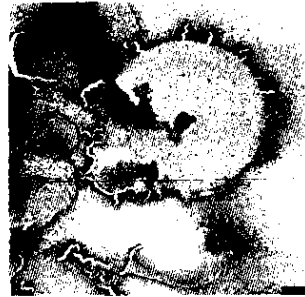
FIGURA 7

49

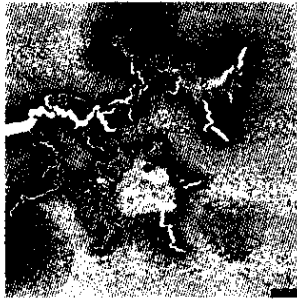
A)



B)



C)



D)



FIGURA 8

50

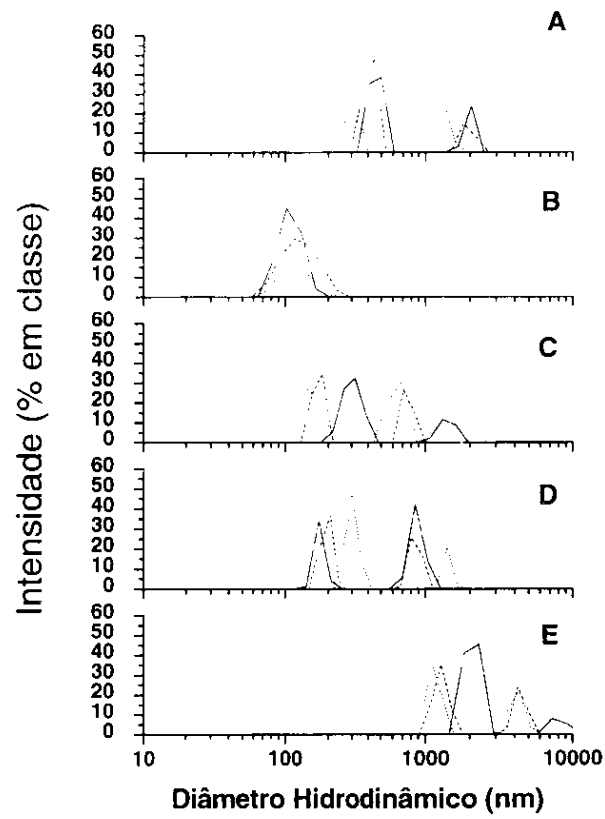
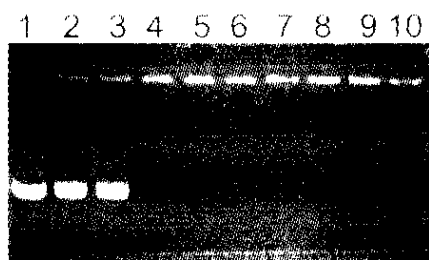


FIGURA 9

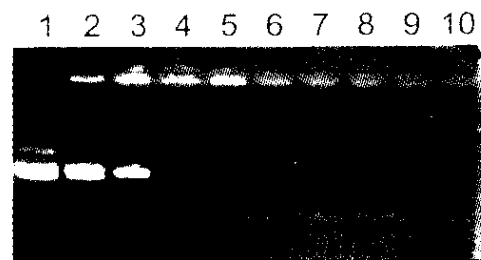


FIGURA 10

A



B



C

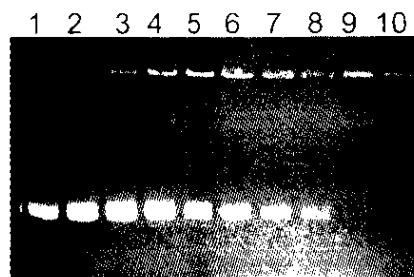


FIGURA 11

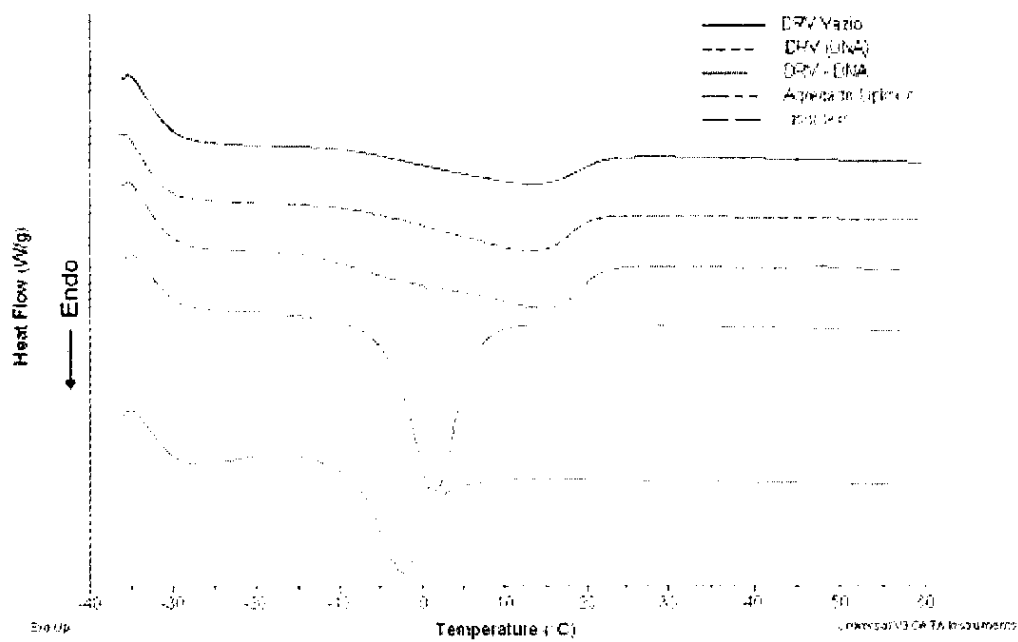


FIGURA 12

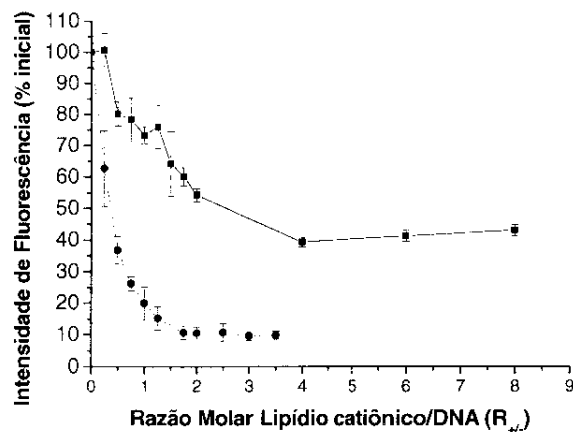


FIGURA 13

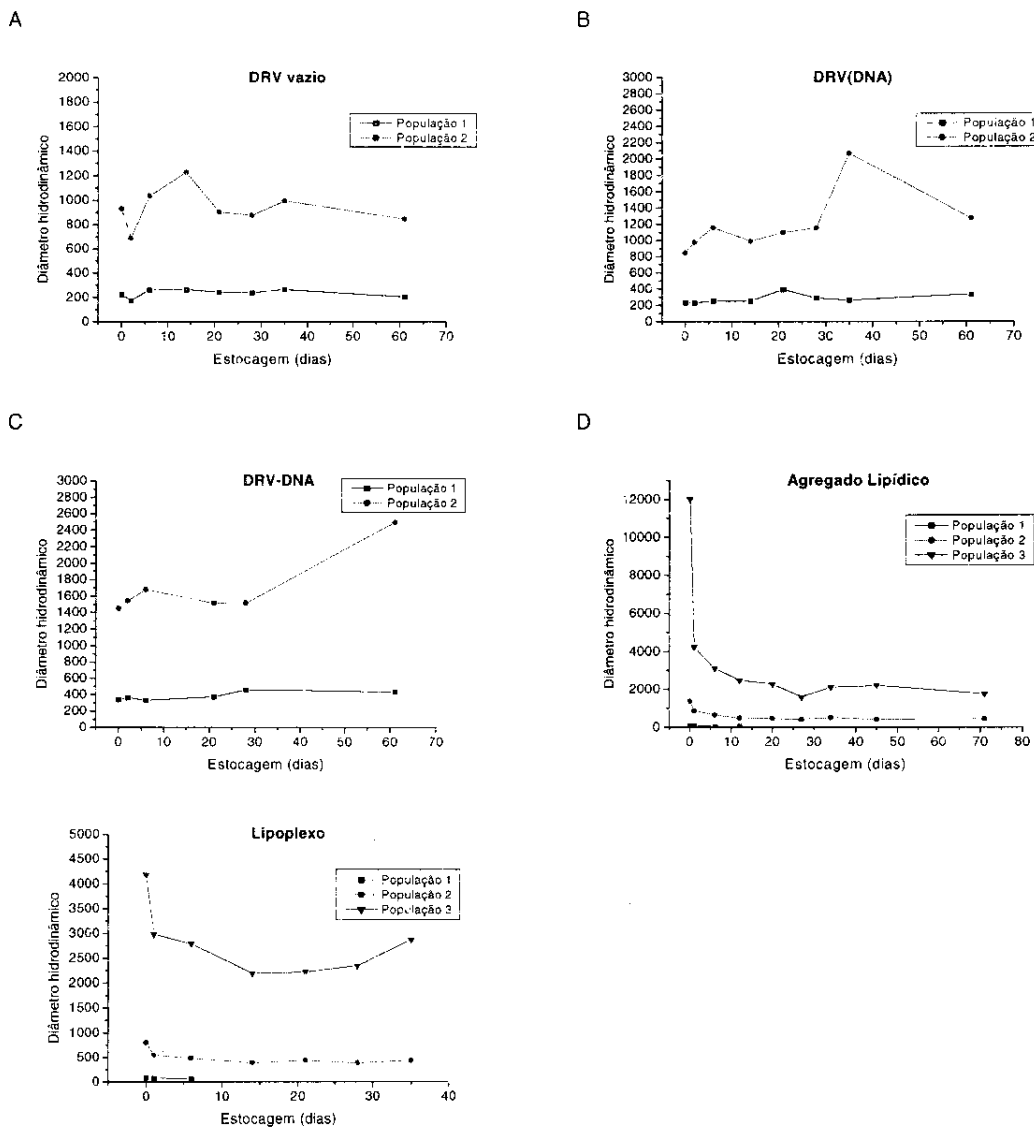


FIGURA 14

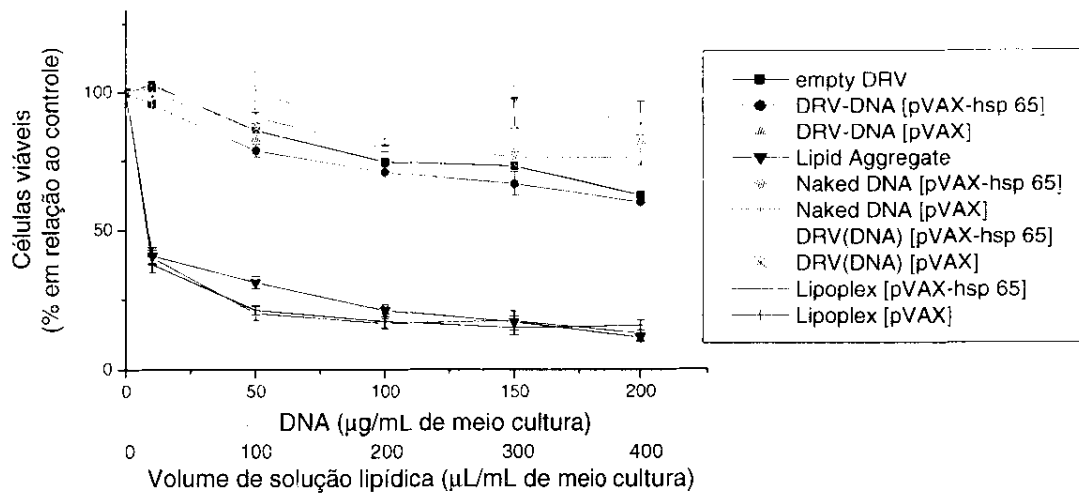


FIGURA 15

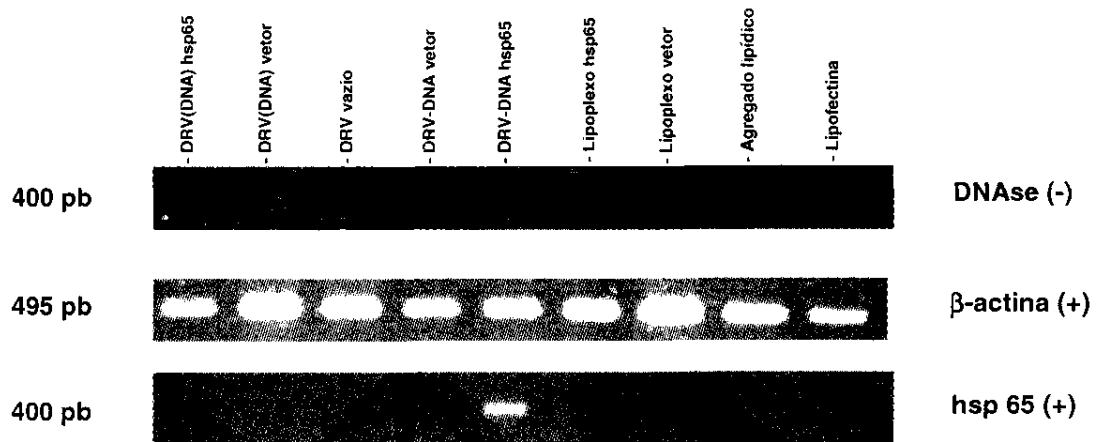


FIGURA 16

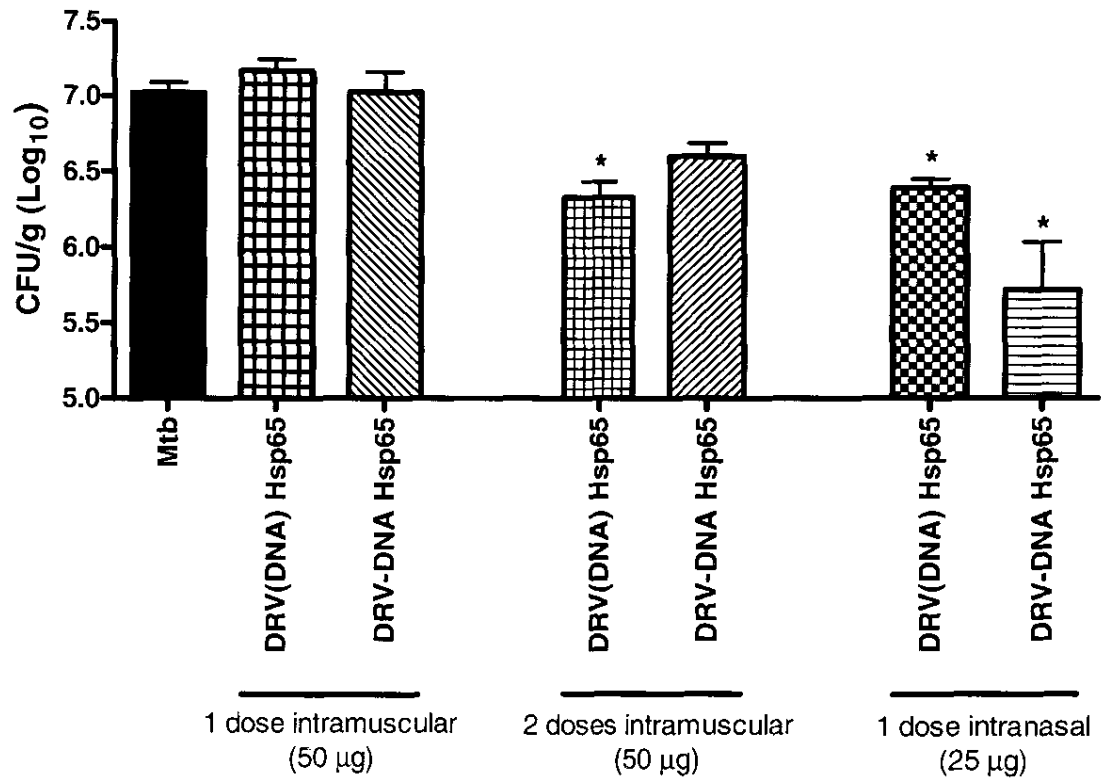


FIGURA 17