

(12) **PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2020.07.03</b>	(73) Titular(es): <b>UNIVERSIDADE DO MINHO</b> <b>LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA</b>	<b>PT</b>
(30) Prioridade(s):		
(43) Data de publicação do pedido: <b>2022.02.11</b>	(72) Inventor(es): <b>JOSÉ ANTÓNIO COUTO TEIXEIRA</b> <b>IVO EDGAR ARAÚJO LOPES</b> <b>ANDREIA FERREIRA DE CASTRO GOMES</b> <b>CLÁUDIA MANUELA DA CUNHA FERREIRA BOTELHO</b> <b>MÁRIO ISMAEL CARDOSO FERNANDES</b>	<b>PT</b> <b>PT</b> <b>PT</b> <b>PT</b> <b>PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: /	(74) Mandatário: <b>MARCO ALEXANDRE GOMES DA SILVA PIRES DE SOUSA</b> <b>RUA QUINTA DO MONTE, 96 - 1º DTO. 4805-151 CALDAS</b> <b>DAS TAIPAS</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **LIPOSSOMAS MIMÉTICOS DE EXOSSOMAS: COMPOSIÇÃO E USO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO É RELATIVA A LIPOSSOMAS MIMÉTICOS DE EXOSSOMAS (EXOLIPOSSOMAS) FUNCIONALIZADOS PARA VEICULAÇÃO E LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE COMPOSTOS BIOATIVOS. MAIS ESPECIFICAMENTE, OS LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS FUNCIONALIZADOS SÃO COMPOSTOS POR UMA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA QUE MIMÉTICA A COMPOSIÇÃO DOS EXOSSOMAS, PARA A VEICULAÇÃO E LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE COMPOSTOS BIOATIVOS PARA DIVERSAS APLICAÇÕES. ESPECIFICAMENTE ESTES LIPOSSOMAS PODEM SER PREFERENCIALMENTE USADOS PARA APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS, MAS TÊM APLICAÇÕES QUE SE ESTENDEM A INDÚSTRIAS COMO AS DA COSMÉTICA E DA NUTRIÇÃO. PARTICULARMENTE, ESTES LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS PODEM SER USADOS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS DE CURA DIFÍCIL, COMO O CANCRO E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS COMO ALZHEIMER E PARKINSON. ELES PODEM TAMBÉM SER USADOS NO TRATAMENTO DE FERIDAS, COMO COMPOSTOS ANTI-ENVELHECIMENTO OU NUTRACÊUTICOS, POR EXEMPLO, COMO PRÉ-BIÓTICOS.

## RESUMO

### LIPOSSOMAS MIMÉTICOS DE EXOSSOMAS: COMPOSIÇÃO E USO

A presente invenção é relativa a lipossomas miméticos de exossomas (exo-lipossomas) funcionalizados para veiculação e libertação controlada de compostos bioativos. Mais especificamente, os lipossomas nanométricos funcionalizados são compostos por uma composição lipídica que mimética a composição dos exossomas, para a veiculação e libertação controlada de compostos bioativos para diversas aplicações. Especificamente estes lipossomas podem ser preferencialmente usados para aplicações farmacêuticas, mas têm aplicações que se estendem a indústrias como as da cosmética e da nutrição. Particularmente, estes lipossomas nanométricos podem ser usados no tratamento de doenças de cura difícil, como o cancro e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. Eles podem também ser usados no tratamento de feridas, como compostos anti-envelhecimento ou nutracêuticos, por exemplo, como pré-bióticos.

## DESCRIÇÃO

### LIPOSSOMAS MIMÉTICOS DE EXOSSOMAS: COMPOSIÇÃO E USO

#### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a lipossomas, miméticos de exossomas, funcionalizados para a veiculação e libertação controlada de compostos bioativos. Mais especificamente, estes sistemas funcionalizados consistem em lipossomas nanométricos com uma composição lipídica mimética à dos exossomas, para a veiculação e libertação controlada de compostos bioativos para diversas aplicações. Especificamente estes lipossomas nanométricos podem ser usados preferencialmente em aplicações farmacêuticas, mas têm também aplicações em indústrias como a da cosmética e da nutrição. Em particular, estes lipossomas nanométricos podem ser usados na preparação de medicamentos para o tratamento de doenças de difícil cura, como o Alzheimer, o Parkinson e o cancro.

#### ENQUADRAMENTO DA INVENÇÃO

Os exossomas são vesículas extracelulares (EVs) que são libertadas por diferentes células no organismo. Estas vesículas encapsulam diversas biomoléculas, como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, que desempenham um papel na comunicação celular quer no seu microambiente circundante, quer em tecidos distantes no organismo. Algumas funções conhecidas dos exossomas incluem modelação imunológica e promoção da angiogénese e metastização tumoral.

Como referido, estas nanopartículas lipídicas naturalmente ocorrentes, permite a comunicação entre células a longas distâncias, e por isso elas têm que perdurar na circulação sanguínea em condições fisiológicas e evadir o reconhecimento pelo sistema imunológico. A sua composição molecular única

permite-lhes sobreviver em circulação, sendo que a sua composição lipídica, que promove a formação de balsas lipídicas e aumenta a sua rigidez membranar, é fundamental para o seu tempo aumentado em circulação sanguínea.

A composição da bicamada lipídica dos exossomas é constituída maioritariamente por lípidos da membrana plasmática das células parentais, que incluem esfingomiéline (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), gangliosídeo GM3 (GM3), e fosfatidilinositol (PI). Seleção lipídica leva ao enriquecimento dos exossomas em fosfolípidos, como o PI, SM e GM3 e em lípidos neutros, como o colesterol (Chol) e ceramidas. Os exossomas têm membranas rígidas, caracterizadas por uma fase lipídica *Lo* ordenada. Esta rigidez é devida à presença de uma concentração elevada de PC e PE insaturados, SM e chol. Esta característica é responsável pela presença duradoura dos exossomas em fluidos biológicos, uma vez que os protege das enzimas lipolíticas circulantes.

Pensa-se que a SM e o Chol formem ligações de hidrogénio, o que resulta no empacotamento apertado de bicamadas de SM/Chol. Assim, a incorporação destes lípidos em sistemas miméticos de exossomas pode aumentar a sua rigidez e estabilidade. De facto, lipossomas contendo SM/Chol demonstraram ser resistentes à inserção de proteínas plasmáticas e ter elevados tempos de circulação (tempos de meia-vida de 16 h).

Em adição à SM e ao Chol, gangliosídeos, como o GM3, podem estabilizar a membrana exossomal, escudando as vesículas dos componentes sanguíneos, devido ao impedimento estérico dos grandes grupos hidrofílicos das suas cabeças. De facto, os gangliosídeos, a SM, e o Chol mostraram que podem atuar

sinergicamente para reduzir a internalização de lipossomas pelo sistema reticuloendotelial (RES) tanto *in vitro* como *in vivo*.

Os exossomas têm virtudes únicas como elevado direcionamento passivo, devido ao seu tamanho nanométrico (30-200 nm), natureza endógena, que lhes confere uma excelente biocompatibilidade, habilidade de evadir a internalização pelo RES, e de atravessar barreiras biológicas, características que os tornam apelativos para várias aplicações biomédicas, como entrega controlada de fármacos.

Apesar do interesse nestas vesículas ser bastante recente, o Mercado de diagnóstico e terapêutico estava avaliado em 39 milhões de dólares em 2014 e espera-se um incremento de 10 vezes até 2022, de acordo com o relatório publicado pela Allied Market Research intitulado, "Exosome Diagnostic and Therapeutic Market by Application, Product, End User, and Geography - Global Opportunity Analysis and Industry Forecasts, 2014 - 2022,". Há empresas a usar exossomas para aplicações terapêuticas com sucesso. Nos Estados Unidos da América a empresa Exosome Diagnostics usa exossomas de vários fluidos orgânicos para diagnóstico, particularmente de mutações cancerígenas raras, e a empresa Aethlon Medical utiliza exossomas para o diagnóstico de doenças neurológicas. Eles desenvolveram o TauSome™, um biomarcador exossomal que é um candidato para a deteção de encefalopatia traumática crónica em pacientes vivos.

O número de empresas a trabalhar com exossomas na Europa é reduzido, contudo empresas como a LSistemic Inc, no Reino Unido, usam exossomas para a análise da expressão de miRNA e a Exiqon A/S, na Dinamarca, usa exossomas para o diagnóstico do cancro da próstata.

Contudo, a aplicação dos exossomas é severamente limitada pela natureza inconveniente dos métodos necessários ao seu isolamento, purificação e para o encapsulamento de fármacos, que resultam em baixos rendimentos quer de exossomas puros quer de encapsulamento, entre outros problemas.

O isolamento de exossomas de elevada qualidade de culturas celulares ou fluidos biológicos é vital para terapias baseadas em exossomas. A centrifugação diferencial, baseada na densidade de flutuação, é o protocolo mais usado no isolamento e purificação de exossomas, sendo que o rendimento médio de coleção de exossomas é de cerca de 50 µg por 100 ml ( $2-5 \times 10^7$  células) de sobrenadante de cultura celular.

Várias estratégias alternativas estão a ser implementadas para o isolamento e purificação de exossomas, como a filtração, o isolamento por imunoafinidade, e técnicas de microfluídica, mas estão ainda numa fase embrionária de desenvolvimento, e não resultaram numa melhoria significativa dos rendimentos de isolamento e purificação.

O carregamento de moléculas nos exossomas pode ser classificado como estratégias *ex vivo* e *in vitro*. No carregamento *in vitro* a carga é incorporada nas células doadoras durante a biogénese dos exossomas, enquanto que no carregamento *ex vivo*, os exossomas são purificados e posteriormente carregados com os compostos terapêuticos por electroporação, incubação simples, ciclos de congelamento/descongelamento, sonicação, e extrusão e permeabilização.

As modificações biológicas são os métodos mais estudados nos sistemas de entrega de fármacos baseados em exossomas, modificando-se as células doadoras, *in vitro*, de modo a produzirem os compostos terapêuticos desejados e/ou moléculas para promover entrega seletiva mediada por recetor.

Ambas as estratégias *in vitro* e *ex vivo* resultam em eficiências de encapsulamento muito baixas, adicionalmente, a modificação das células doadoras para produzirem exossomas com a carga terapêutica e moléculas para entrega seletiva é um processo difícil e dispendioso.

Finalmente, como a composição dos exossomas é extremamente relacionada com a sua origem celular, a terapia com exossomas alogénicos é problemática devido a potenciais respostas imunogénicas. Considerando que os exossomas transportam um conjunto característico de proteínas e moléculas funcionais do complexo principal de histocompatibilidade, a utilização exossomas alogénicos pode despoletar uma reação potente pelo sistema imunitário do recetor.

Adicionalmente, exossomas isolados de células cancerígenas incluem moléculas que refletem a sua origem oncogénica, e transferem oncogenes, promovem proliferação, angiogénese, metástases, e resistência a fármacos.

Há cada vez mais evidências que exossomas derivados de células cancerígenas promovem oncogenicidade nas células recetoras, e podem consequentemente, contribuir para a progressão do cancro através de comunicação intercelular local e sistémica.

Diversos documentos, patentes e pedidos de patentes têm sido submetidos neste assunto, e estes documentos mostram que o

estado atual dos exossomas como veículo para entrega de fármacos continua dependente das células parentais que os originam. Alguns exemplos destes documentos são US9,555,060, US10,233,445, US2017/0135915, US2017/0183686, WO2019/071031 e WO2018/208670.

Estas metodologias apresentam sérias limitações, muitas delas já aqui apontadas, à implementação dos exossomas.

A metodologia descrita em US9,555,060, depende da transfecção das células parentais MCS, L9 glioma e HEK, com plasmídeos codificando miRNAs anti-cancerígenos (miR-146b). É sabido que os protocolos de transfecção são árduos, dispendiosos e frequentemente ineficazes em promover a expressão de material genético exógeno. É referido que o uso de células para produzir o miRNA, e depois incorporá-lo nos exossomas é vantajoso comparativamente com o processo de encapsulamento de lipossomas e outras nanopartículas. Contudo, isto não é verosímil, uma vez que, da incorporação de RNA em lipossomas, especialmente nos que contêm lípidos ou surfactantes catiónicos, resulta em eficiências de encapsulamento de perto de 100%.

Em US10,233,445, para além de se transfectar as células parentais para expressar uma proteína transmembranar, em fusão com uma molécula para conferir seletividade, à superfície dos exossomas, a incorporação do material genético é feita por electroporação e transfecção dos próprios exossomas com um agente de transfecção baseado em lipossomas catiónicos. Contudo, a capacidade de incorporação de material genético em exossomas isolados de células, i.e. que contêm grandes quantidades de material genético à partida, é uma grande problemática.



O documento US2017/0183686 afirma que os métodos de introdução de ácidos nucleicos nos exossomas (electroporação, transfecção com reagentes baseados em lípidos catiónicos e ultracentrifugação) resultam em eficiências de encapsulamento muito baixas, estimando o encapsulamento de 1 molécula de siRNA por 1000 exossomas. A metodologia usada nesta publicação para introduzir o material genético nos exossomas, consiste na modificação dos ácidos nucleicos com moléculas hidrofóbicas, o que levanta a questão de quão protegidos estão os ácidos, uma vez que, os ácidos nucleicos encapsulados estão provavelmente ancorados ou aderidos à superfície dos exossomas, e desta forma expostos a eliminação em contexto terapêutico, sabendo-se que os ácidos nucleicos são rapidamente degradados pelas endonucleases.

Em US2017/0135915 é referido que o uso de material genético exógeno e células de rato nos métodos para a obtenção de exossomas, introduz riscos inaceitáveis de tumorigenicidade e infecção por agentes xenozoóticos. Em particular, a preparação de exossomas é dependente de células de risco biológico, de fontes como o rato, e de metodologias complexas que os tornam extremamente difíceis de produzir em contexto farmacêutico, compatível com produção em larga escala e administração clínica segura.

Adicionalmente, o potencial dos exossomas para entrega de fármacos está fora de questão, contudo continua largamente inexplorado devido às problemáticas anteriormente mencionadas.

As nanopartículas miméticas de exossomas começaram conseqüentemente a ser produzidas. Estes veículos têm como intuito reter as características vantajosas dos exossomas

mitigando ao mesmo tempo alguns das suas limitações, como os seus longos protocolos de extração e purificação, bem como as suas baixas eficiências de encapsulamento. Adicionalmente, a funcionalização de nanopartículas miméticas de exossomas é mais fácil.

No estado da arte existem vários procedimentos para a produção de exossomas por extrusão seriada. Células NIH3T3 extrudidas através de membranas de policarbonato de 10, 5 e 1  $\mu\text{m}$ , originam nanopartículas miméticas de exossomas com aproximadamente 150 nm, capazes de encapsular siRNA, alvejar e reduzir a expressão do fator de crescimento celular, c-Myc, em células  $\lambda 820$ . Esta técnica foi também aplicada na produção de nanopartículas miméticas de exossomas a partir de monócitos humanos, U937, para a entrega seletiva de compostos quimioterapêuticos, como a doxorubicina, em tumores malignos, e a partir de células T, CD8+, capazes de suprimir células T efectoras, por entregarem miRNA inibidor. Adicionalmente, esta técnica foi também usada na preparação de nanopartículas miméticas de exossomas a partir de hepatócitos primários, que promovem a proliferação de hepatócitos e regeneração do fígado.

A extrusão seriada é a técnica mais usada na produção de nanopartículas miméticas de exossomas, existe já algum trabalho na sua produção por abordagens de baixo para cima, por exemplo, produziram-se nanopartículas de sílica miméticas de exossomas para utilização em ultrassonografia, uma vez que estas são internalizadas por células e retrodifundem ondas ultrassónicas.

Foram também produzidos híbrido miméticos de exossomas pela mistura exossomas derivados de células HEK293FT com

lipossomas. Estes híbridos foram usados para encapsular e entregar o Sistema de clivagem CRISPR/Cas9 em células mesenquimatosas humanas, uma vez que este sistema é demasiado grande para ser encapsulado apenas em exossomas.

Esta nova invenção, um Sistema lipossomal, tem como objetivo mitigar algumas das desvantagens da aplicação dos exossomas como dispositivos para entrega de fármacos, mas mantendo as características que os tornam apelativos para a entrega de fármacos.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A invenção presente relaciona-se com lipossomas miméticos de exossomas (exo-lipossomas) funcionalizados para a veiculação e libertação controlada de compostos bioativos. Mais especificamente, os exo-lipossomas funcionalizados são lipossomas nanométricos com uma composição lipídica que mimetiza a dos exossomas. Estes lipossomas nanométricos retêm várias características dos exossomas como acumulação passiva aumentada, biocompatibilidade, evasão do RES, e habilidade de atravessar barreiras biológicas. Estas características tornam-nos superiores às nanopartículas lipídicas atualmente no mercado, ou às expostas anteriormente no estado da arte, e permitem elevadas eficiências de encapsulamento e produção em larga escala. Uma vez que os lipossomas nanométricos da presente invenção preservam as características dos exossomas, eles têm grande aplicabilidade para a veiculação e libertação controlada de compostos bioativos para diversas aplicações. Especificamente, estes lipossomas nanométricos podem ser usados preferencialmente para aplicações farmacêuticas, mas a sua aplicabilidade estende-se a indústrias como as da cosmética e nutrição. Estes lipossomas nanométricos podem particularmente, ser usados na preparação fármacos para o

tratamento de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e o Parkinson, do cancro, de feridas, como compostos anti-envelhecimento ou nutracêuticos, por exemplo, como pré-bióticos.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

As figuras seguintes ilustram as modalidades preferenciais da publicação, e não devem ser vistas como delimitantes do alcance da invenção.

A presente publicação é melhor compreendida pela leitura da descrição detalhada que se segue, em conjunção com as figuras que a acompanham. Enfatiza-se que, de acordo com as práticas comuns, os vários elementos das imagens não se encontram em escala. Pelo contrário, as dimensões dos vários elementos são arbitrariamente expandidas ou reduzidas para melhor clareza.

O presente documento inclui as seguintes figuras:

**Figura 1** representa o tamanho e a carga superficial dos exolipossomas sem ou encapsulando curcumina. Tamanho (barra) e polidispersividade (PDI) (pontos).

**Figura 2** representa a estabilidade, relativa à variação do tamanho, de lipossomas vazios sem DODAP.

**Figura 3** representa a viabilidade celular (determinada pelo ensaio da resazurina) da linha celular L929 incubada com exolipossomas com DODAP.

**Figura 4** representa a viabilidade celular (determinada pelo ensaio da resazurina) da linha celular L929 incubada com exolipossomas sem DODAP.

**Figura 5** representa a viabilidade eritrócitos de porco (determinada pela hemólise) incubados com exo-lipossomas com e sem 10% de curcumina.

**Figura 6** representa a viabilidade celular (determinada pelo ensaio da resazurina) da linha celular SH-SY5Y incubada com exo-lipossomas encapsulando curcumina.

**Figura 7** é a representação da internalização da curcumina nas células SH-SY5Y.

**Figura 8** é uma representação dos efeitos neuroprotectores dos exo-lipossomas, encapsulando curcumina, nas células SH-SY5Y, usando-se 1  $\mu\text{M}$  de Hidroperóxido de Terc-Butilo (t-BHP) para a indução de stress oxidativo.

**Figura 9** é uma representação da percentagem de ROS produzidos pelas células SH-SY5Y, em cada condição, onde a percentagem é expressa em relação ao controlo com Hidroperóxido de Terc-Butilo (t-BHP).

**Figura 10** é uma representação da percentagem de células SH-SY5Y não-apoptóticas, em cada condição.

**Figura 11** é uma representação das células SH-SY5Y apoptóticas incubadas em diferentes condições.

**Figura 12** é uma representação do tamanho e da carga superficial dos exo-lipossomas, com DODAP e concentrações crescentes de siRNA.

**Figura 13** é uma representação do tamanho e carga superficial dos exo-lipossomas, com DODAP e 5 e 10 µg/mL de albumina de soro bovino (BSA).

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A invenção presente relaciona-se com lipossomas miméticos de exossomas funcionalizados para a veiculação e libertação controlada de compostos bioativos. Mais especificamente, estes exo-lipossomas são lipossomas nanométricos com uma composição lipídica que mimetiza a dos exossomas. Estes lipossomas nanométricos retêm várias características dos exossomas como acumulação passiva aumentada, biocompatibilidade, evasão do RES, e habilidade de atravessar barreiras biológicas. Estas características tornam-nos superiores às nanopartículas lipídicas atualmente no mercado, ou às expostas anteriormente no estado da arte, e permitem elevadas eficiências de encapsulamento e produção em larga escala.

De maneira geral, os exo-lipossomas funcionalizados foram desenvolvidos com tamanhos entre os 30 e os 800 nm, preferivelmente entre os 50 e os 500 nm, mais preferivelmente entre os 80 e os 300 nm, e ainda mais preferivelmente entre os 80 e os 200 nm, apresentado uma carga neutra ou ligeiramente negativa, que são as características ideais para a administração intravenosa, uma vez que as nanopartículas carregadas são rapidamente opsonizadas pelas proteínas do soro, e reconhecidas pelos efetores do sistema imunitário, e que partículas maiores podem causar a oclusão nos vasos sanguíneos mais pequenos. Particularmente, o valor de potencial zeta definido como ligeiramente negativa deve ser compreendido ente os 0 e os -10 mV.

Na invenção presente, o tamanho dos lipossomas dependerá da carga a incorporar no sistema. O tamanho irá influenciar a habilidade dos lipossomas de atravessar barreiras, como os capilares estreitos da barreira hematoencefálica, e de evitar a eliminação da circulação sistêmica pela opsonização mediada por anticorpos, ou reconhecimento pelo sistema imunitário. Tendo isto em consideração, alguém com conhecimento no estado da arte sabe que os intervalos de tamanho mencionados acima não são limitativos do âmbito desta invenção, e uma pequena variação do tamanho não é limitante para o sistema devido às suas características aqui detalhadas.

Aquando da fase de desenvolvimento, a preparação dos lipossomas miméticas dos exossomas é efetuada pelos métodos usuais ao estado da arte. Especificamente, os métodos usuais são a hidratação do filme lipídico ou a injeção etanólica, seguidos de extrusão, para definir o tamanho final dos lipossomas. Em fases mais avançadas, para produção em larga escala e aplicação clínica, os lipossomas serão produzidos por microfluídica, onde a solução lipídica em etanol, ou outro solvente orgânico, flui através de um canal central, contido por outros dois fluxos laterais de água. Isto permite uma melhor definição das propriedades dos lipossomas pelo controle da área de formação dos lipossomas, da velocidade e dispersividade da solução lipídica central, entre outras características.

Numa concretização preferencial da presente invenção, os exolipossomas são preparados por injeção etanólica, numa composição farmacêutica composta por pelo menos um composto bioativo, um polímero e um veículo farmacêuticamente aceitável, composto por fosfolípidos, lípidos que não fosfolípidos, colesterol e seus derivados. Na presente invenção, o termo "lípidos que não fosfolípidos" inclui também derivativos de lípidos que não fosfolípidos onde se fizeram

modificações aos lípidos que não fosfolípidos. Neste exemplo em particular os lípidos que se seguem são os mais relevantes: colesterol, DPPC, esfingomiéline, DODAP e PEG-cerâmida.

Mais particularmente, o composto bioativo é uma molécula hidrofóbica ou hidrofílica. Particularmente, o composto bioativo hidrofílico pode ser selecionado do seguinte grupo: açúcares, ácidos nucleicos, proteínas, doxorubicina, fenóis, moléculas fitoquímicas, entre outras. Relativamente aos compostos bioativos hidrofóbicos, eles podem ser selecionados do seguinte grupo: curcumina, resveratrol, paclitaxel, entre outros. Adicionalmente, as moléculas bioativas podem ser também sintetizadas, e a mistura de compostos bioativas pode incluir moléculas naturais e sintéticas. Particularmente, o composto bioativo é selecionado de um grupo de moléculas lipofílicas e hidrofílicas como curcumina, albumina do soro bovino (BSA) e siRNA. Contudo, alguém conhecedor do estado da arte sabe que os compostos mencionados são exemplos dos que podem ser usados, e não devem ser restritivos das opções da presente invenção.

Alguns exemplos de fosfolípidos naturais ou sintéticos incluem a fosfatidilcolina, fosfatidil glicerol, fosfatídeos, fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, esfingomiéline (SM), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), cardiolipina, e seus produtos hidrogenados (por exemplo, fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC)) ou uma mistura destes. Para o propósito desta invenção, os fosfolípidos selecionados foram a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e a esfingomiéline (SM).



Exemplos de colesteróis incluem, mas não devem ser limitados a estes, o ovino, bovino, e derivados de planta entre outros. O preferencial para esta aplicação é o colesterol ovino.

Os polímeros hidrofílicos preferencialmente usados são os polietilenoglicóis, poliglicerois, polipropilenoglicóis, alcois de polivinil, um copolímero de anidrido estireno/maleico, polivinilpirrolidona e poliaminas. Particularmente, o polietilenoglicol (PEG), poliglicerol (PG), polipropilenoglicol (PPG) ou uma mistura deles. O PEG é o mais comumente usado, uma vez que aumenta a retenção dos lipossomas na circulação sanguínea, tendo sido este o polímero selecionado para ser usado na presente invenção, mais particularmente a PEG-ceramida (PEG-cer).

Na composição da presente invenção, é preferível usar um lípido modificado com PEG, em conjunção com o resto dos lípidos componentes dos lipossomas. Exemplos de lípidos modificados com PEG incluem 1,2-diestearoil-3-fosfatidiletanolamina-polietilenoglicóis como o 1,2-diestearoil-3-fosfatidiletanolamina-PEG2000, 1,2-diestearoil-3-fosfatidiletanolamina-PEG5000 e o diestearoil glicerol-PEG2000.

Nesta invenção podem também ser usados surfactantes catiónicos como, mas não limitados a, 1,2-dioleoil-3-dimetil amónio-propano (DODAP), brometo de dioctadecildimetilamónio (DODAB), cloreto de dioctadecildimetilamónio (DODAC), 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamónio propano (DOTMA) ou 1,2-dioleoil-3-trimetilamónio-propano (DOTAP), para encapsular moléculas negativamente carregadas, como RNAs de interferência. O surfactante preferível para esta invenção foi o DODAP.

É ainda possível adicionar vários tipos de gangliosídeos à formulação como o GM1 ou o GM3. Há outros tipos de gangliosídeos que poderiam ser usados na formulação, como o GM2, mas para esta invenção em particular, os gangliosídeos preferenciais serão os primeiros dois enumerados.

Os lipossomas são preparados com uma composição lipídica contendo pelo menos um dos seguintes compostos:

- 20 a 60% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de colesterol (Chol);
- 15 a 40% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC);
- 0 a 25% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP);
- 0 a 25% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de fosfatidilcolina (PC);
- 0 a 25% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de fosfatidilserina (PS);
- 1 a 10% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de N-palmitoil-esfingosina-1-succinil[metoxi(poletilenoglicol)2000] (PEG-Cer);
- 5 a 20% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de gangliosídeos (GM1 e/ou GM3) e
- 5 a 40% de pelo menos um composto bioativo.

Estes lipossomas auto-organizam-se quando entram em contacto com soluções tamponadas de HEPES, citrato, entre outros, por injeção etanólica, em ciclos de 20 segundos de imersão num banho maria a 60°C, seguidos de 20 segundos de vortexação vigorosa. Enquanto em suspensão, e como resultado da falta de carga superficial para promover repulsão, eles tendem a fundir e agregar. Assim, incluiu-se uma ceramida acoplada a PEG (2000), para promover impedimento estérico e impedir os lipossomas de coalescerem e agregarem, bem como prevenir o reconhecimento das nanopartículas pelo sistema imunitário.

O polímero PEG tem elevada solvatação à sua superfície, e possui uma grande esfera de hidratação, que previne assim as membranas dos lipossomas de entrarem em contacto e fundir. Adicionalmente, esta esfera de hidratação escuda as membranas

dos lipossomas da interação com as proteínas soro, e do reconhecimento do sistema imunitário.

A ceramida deste lípido modificado com PEG promove a mistura lipídica, aquando da internalização celular por endocitose mediada por recetor, promovendo a libertação da carga terapêutica do endossoma, uma vez que se sabe que estes lípidos saltam entre membranas em contacto próximo.

Dependendo do método de preparação e da natureza dos compostos bioativos como a curcumina, o siRNA ou a BSA, eles serão encapsulados nos lipossomas usando métodos diferentes:

1) se a preparação dos lipossomas for feita pelo método da hidratação do filme lipídico, que consiste na formação de um filme lipídico pela secagem de uma solução lipídica previamente dissolvida em etanol ou clorofórmio. Isto é conseguido usando um evaporador rotativo ou um fluxo de azoto. Posteriormente este filme é hidratado com água ou uma solução aquosa tamponada biocompatível.

1.1) se os compostos bioativos são hidrofílicos: eles serão encapsulados no lúmen aquoso dos lipossomas, quando o filme lipídico for hidratado com a solução tamponada contendo o composto terapêutico.

1.2) se os compostos terapêuticos são hidrofóbicos: eles serão misturados com os lípidos num solvente orgânico, como o etanol ou o clorofórmio, e integrarão o filme lipídico formado aquando da evaporação do solvente orgânico. Após a hidratação do filme lipídico estes compostos serão encapsulados na membrana dos lipossomas.

2) se os lipossomas forem preparados por injeção etanólica ou microfluídica e;

2.1) os compostos terapêuticos são hidrofílicos: eles serão encapsulados no lúmen aquoso dos lipossomas, quando a mistura lipídica entra em contacto com a solução tamponada contendo os compostos terapêuticos.

2.2) os compostos terapêuticos são hidrofóbicos: eles serão misturados com os lípidos num solvente orgânico, e serão encapsulados nas membranas dos lipossomas quando a mistura lipídica entra em contacto com a solução tamponada, contendo os compostos terapêuticos.

Adicionalmente, em todos os métodos, hidratação do filme lipídico, injeção etanólica e microfluídica, caso o composto bioativo a encapsular seja por exemplo, um ácido nucleico, incluir-se-á DODAP na formulação. O DODAP é uma molécula positivamente carregada a Ph ácido, e neutra a Ph neutro. A inclusão deste componente na formulação vai promover o encapsulamento de ácidos nucleicos, através da atração electrostática dos grupos fosfatos negativamente carregados destas moléculas, e as moléculas positivamente carregadas de DODAP, enquanto em solução tamponada acídica (pH 3 to 5). Após a preparação, a solução tampão será trocada por uma a pH neutro, de modo a que os lipossomas adquiram a carga neutra desejada. Como mencionado anteriormente a pH ácido as moléculas de DODAP têm carga positiva, podendo assim atrair electrostaticamente moléculas negativas e promover o seu encapsulamento. Contudo, uma vez que a carga positiva pode ser prejudicial para as membranas celulares, pois pode, entre outras coisas, alterar o potencial membranas, e diminuir, por exemplo, as trocas de moléculas entre as células e o meio extracelular. A pH neutro, este composto torna-se neutro, e deixa de interferir com o potencial de membrana, mantendo-se este processo inalterado, e explicando a toxicidade reduzida deste surfactante a pH neutro.

Para se conseguir especificidade dos exo-lipossomas para o sítio de ação, funcionalizar-se-á a sua superfície com substâncias com elevada afinidade para as células ou tecidos pretendidos.

Alguém com conhecimento na arte saberá que esta funcionalização pode ser efetuada, por exemplo, através da ligação de grupos tiol na molécula que atribuirá especificidade, e os grupos maleimida à superfície dos lipossomas. Nesta aplicação especificamente, serão produzidas micelas de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[(polietilenoglicol)-2000-maleimida], por hidratação do filme lipídico, e deixar-se-ão reagir os grupos maleimida das micelas com as moléculas que atribuirão especificidade. Posteriormente estas micelas, com as moléculas de interesse a si ligadas, serão adicionadas aos lipossomas (de 2 a 10%  $\text{mol}/\text{mol}$  do lípido total), a uma temperatura acima da transição de fase (usualmente acima de 60°C, mas pode variar dependendo da mistura lipídica final, por exemplo, a temperatura pode variar entre os 40 e os 100°C), de modo a se promover a fusão. Como é sabido na literatura, este procedimento assegura que, depois da fusão entre as micelas e os lipossomas, as moléculas que atribuirão especificidade estarão no exterior dos lipossomas, e assim disponíveis para reação com os recetores a alvejar.

Numa concretização preferível da presente invenção, todos os exo-lipossomas serão preparados por injeção etanólica. Como alguém com conhecimento na área saberá, esta técnica consiste na injeção dos lípidos, dissolvidos em etanol, numa solução aquosa, muito usada devido a produzir lipossomas pequenos, de baixa polidispersividade, bem como a facilitar a produção em larga escala.

Brevemente, para uma concretização preferível da presente invenção, a mistura de lípidos, por exemplo, Chol:DPPC:SM:PEG-Cer para lipossomas miméticos de exossomas sem DODAP, e Chol:DPPC:DODAP:SM:PEG-Cer, para exo-lipossomas com DODAP, é feita, na composição desejada, em aproximadamente 400  $\mu$ L de etanol, e adicionada, gota-a-gota, a uma solução aquosa sob vortexação vigorosa. Ambas as soluções lipídica e aquosa são previamente aquecidas a uma temperatura acima da temperatura de transição de fase, geralmente a 60°C.

Dependendo da natureza (hidrofílica ou hidrofóbica), os compostos a ser encapsulados podem: (i) ser incluídos na mistura lipídica (quando o composto é hidrofóbico), ou (ii) ser incluídos na solução aquosa (quando o composto é hidrofílico).

Para o propósito da presente invenção, os compostos a ser encapsulados são compostos bioativos como a curcumina, o siRNA ou a BSA, como proteína modelo.

Numa concretização preferível da presente invenção, as composições lipossomais serão obtidas por uma mistura de pelo menos dois lípidos dos exemplos que se seguem, sendo que a composição ideal incorpora a mistura de todos os lípidos na composição. Contudo, numa primeira concretização da presente invenção, a composição dos exo-lipossomas sem DODAP é constituída por:

- 50% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de Chol;
- 30% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de DPPC;
- 15% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de SM;
- 5% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de PEG-Cer; e
- 10% de BSA.

Numa segunda concretização preferível da presente invenção, a composição dos exo-lipossomas sem DODAP é constituída por:

- 50% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de Chol;
- 30% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de DPPC;
- 15% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de SM;
- 5% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de PEG-Cer; e
- 10% de curcumina a 10 mM.

Numa terceira concretização preferível da presente invenção, a composição dos lipossomas miméticas de exossomas com DODAP é constituída por:

- 35% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de Chol;
- 20% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de DPPC;
- 25% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de DODAP;
- 15% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de SM;
- 5% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de PEG-Cer; e
- 10% de BSA ou siRNA.

Numa quarta concretização preferível da presente invenção, a composição dos exo-lipossomas com DODAP é constituída por:

- 35% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de Chol;
- 20% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de DPPC;
- 25% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de DODAP;
- 15% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de SM;
- 5% ( $\text{mol}/\text{mol}$ ) de PEG-Cer; e
- 10% de curcumina a 10 mM.

Os exo-lipossomas preparados foram depois purificados numa coluna de cromatografia de exclusão molecular. Isto permite a separação das frações livre e encapsulada do composto bioativo. Assim consegue-se, após a quantificação rigorosa de uma ou ambas frações, calcular a eficiência de encapsulação dos compostos nos exo-lipossomas.

A figura 1 ilustra diferenças notórias de tamanho entre os exo-lipossomas Chol:DPPC:SM:PEG-Cer e Chol:DPPC:DODAP:SM:PEG-Cer.

O encapsulamento de curcumina parece causar um rearranjo da estrutura vesicular, resultando em maiores tamanhos e índice de polidispersividade.

A estabilidade dos lipossomas foi determinada semanalmente, pela medição do tamanho e polidispersividade, e os lipossomas foram considerados instáveis quando o seu tamanho e polidispersividade aumentaram substancialmente, como visto na figura 2.

Como é evidente na figura, os exo-lipossomas sem carga são estáveis até 6 meses, a 4°C. Contudo, lipossomas com curcumina são estáveis durante apenas 2 meses, à mesma temperatura.

A eficiência de encapsulamento da curcumina foi determinada, pela fluorescência intrínseca da molécula ( $\lambda_{exc}=420$  nm e  $\lambda_{em}=520$  nm), a partir de uma curva de calibração de curcumina e lipossomas vazios, pré-preparados, de concentrações conhecidas. Brevemente, uma curva de calibração foi feita com concentrações crescentes de curcumina e uma concentração contante de lipossomas vazios. Mediu-se então a fluorescência da curcumina e dos exo-lipossomas com curcumina, e a concentração de curcumina nos lipossomas foi extrapolada da curva de calibração previamente descrita. A eficiência de encapsulamento foi determinada considerando estes valores. Como mostrado na tabela 1, a eficiência de encapsulamento da curcumina nos exo-lipossomas com DODAP, depois da purificação, foi de 93.6% (2.65 mM contra os 2.83 mM teóricos), e nos lipossomas sem DODAP foi de 88.1% (0.77 mM contra os 0.87 mM



teóricos). Destas experiências é possível verificar que ambas formulações permitem elevadas eficiências de encapsulamento.

**Tabela 1.** Eficiência de encapsulamento da curcumina de exo-lipossomas com e sem DODAP na formulação ( $\lambda_{exc}=420\text{nm}$ ;  $\lambda_{em}=520\text{nm}$ ).

<b>Amostras</b>	<b>Eficiência de encapsulamento (%)</b>
<b>Exo-lipossomas sem DODAP</b>	88.1
<b>Exo-lipossomas com DODAP</b>	93.6

A biocompatibilidade dos exo-lipossomas foi avaliada pelo estudo dos efeitos na viabilidade celular, usando o ensaio da resazurina, depois da exposição das linhas celulares L929 (fibroblastos de murganho) e SH-SY5Y (neuroblastoma humano) com os exo-lipossomas (Figuras 3 e 4). Células com um metabolismo ativo reduzem a resazurina a resorufina, um produto cor-de-rosa fluorescente. As células foram incubadas com exo-lipossomas por 24 e 48 horas, e passado os tempos de incubação o meio de cultura foi removido, e as células foram incubadas com resazurina durante 2 horas. Posteriormente, mediu-se a fluorescência das soluções de resazurina de todas as condições testadas, e calculou-se a percentagem de células metabolicamente viáveis. Adicionalmente, determinou-se a hemólise pela incubação, durante 30 minutos, de exo-lipossomas com eritrócitos, extraídos de sangue de porco por centrifugações sequenciais, e quantificando a eventual libertação de hemoglobina pela medição da sua absorvância a 540 nm (figura 5).

Estes resultados mostram claramente que os exo-lipossomas com e sem DODAP (Figuras 3 e 4) causam pouca toxicidade às células L929 e SH-SY5Y, sendo a viabilidade celular acima dos 80% em

quase todas as condições estudadas, e quase nenhuma hemólise. Desta forma, verifica-se que estes exo-lipossomas são extremamente biocompatíveis.

Fizeram-se ensaios adicionais de viabilidade metabólica (redução da resazurina) e estudos de internalização (microscopia de fluorescência) em células SH-SY5Y, antes de se fazerem estudos de stresse oxidativo nestas células.

Mais uma vez verificaram-se valores de 80% de viabilidade celular após a incubação das células SH-SY5Y com os exo-lipossomas (Figura 6).

No que diz respeito à internalização celular, figura 7, verificam-se diferenças evidentes entre os dois tempos de incubação (2 e 4 horas) em termos de curcumina internalizada. Depois de 4 h de incubação, é evidente que a internalização da curcumina é superior quando encapsulada nos exo-lipossomas (Figuras 7c, 7b, 7d e 7f), do que na forma livre, como evidência a fluorescência verde da figura 7 (a e b). Não se verificam diferenças substanciais entre as diferentes formulações dos exo-lipossomas.

Para os ensaios de neuroproteção, as células SH-SY5Y foram incubadas com exo-lipossomas com curcumina encapsulada, durante 24 horas, estudando-se depois a sua resposta a um insulto oxidativo, pela incubação com Hidropéroxido de Terc-Butilo (t-BHP), (figura 8). A viabilidade celular foi determinada pela redução da resazurina, a indução apoptose avaliada pela marcação celular com laranja de acridina (AO) e iodeto de propídio (PI), e a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) foi quantificada com a sonda DCFH-DA.

A quantificação da produção de ROS foi feita pela incubação das células com exo-lipossomas, incluído controlos de morte e

viabilidade no ensaio, por 24 horas, e medindo a fluorescência da sonda DCFH-DA, a 495 nm (figura 9).

Das figuras 8 e 9 é possível concluir que ambas formulações (com e sem DODAP) com curcumina encasulada, são eficientes na proteção das células contra insulto oxidativo provocado.

Estes resultados mostram que a curcumina encapsulada neste exo-lipossomas proporciona uma melhor neuroproteção contra o stresse oxidativo, comparativamente com a curcumina livre.

Concorrentemente, as figuras 10 e 11, mostram que células incubadas com exo-lipossomas encapsulando curcumina, são menos propensas a entrar em apoptose tardia, verificando-se assim que exo-lipossomas aumentam a viabilidade celular após insulto oxidativo.

É também de notar que os sistemas encapsulando a curcumina são mais eficientes a proteger as células contra o stresse oxidativo do que a curcumina livre, pois verificam-se menos células com os ácidos nucleicos marcados por iodeto de propídio (PI) (uma sonda vastamente usada para a deteção de células apoptóticas e necróticas) após 24 horas de incubação com os exo-lipossomas e os controlos de morte (30% de DMSO  $v/v$ ) e viabilidade (meio de cultura fresco), e posterior incubação com t-BHP por 2 horas.

Para melhor referencia, a figura 11 mostra células SH-SY5Y apoptóticas incubadas em diferentes condições: a) meio de cultura; b) meio de cultura com 1 mM de t-BHP; c) h) 1 mM de t-BHP e 20 mM de curcumina livre; d) 1 mM de t-BHP e 20  $\mu$ M de curcumina encapsulada em exo-lipossomas sem DODAP; e) 1 mM de t-BHP e 8  $\mu$ M de exo-lipossomas sem DODAP vazios; f) 1 mM de t-BHP e 20  $\mu$ M de curcumina encapsulada em exo-lipossomas com DODAP; e g) 1 mM de t-BHP e 8  $\mu$ M de exo-lipossomas com DODAP vazios.

Isto é verificado pela coloração da sonda, uma vez que se verificam mais células marcadas a verde, uma marcação que indica viabilidade celular, uma vez que, o laranja de acridina marca células viáveis. Quando a coloração celular é laranja ou vermelha, isto é indicativo de que as células estão necróticas ou apoptóticas. Uma coloração laranja é indicativa de apoptose inicial, enquanto uma coloração vermelha é indicativa de apoptose tardia ou necrose.

É adicionalmente claro que existe uma redução na produção de ROS nas células SH-SY5Y, quando incubadas com exo-lipossomas encapsulando curcumina, tendo os sistemas conferido proteção das células neuronais expostas a um insulto oxidativo.

Foi ainda feito trabalho adicional para se estudar o encapsulamento compostos hidrofílicos, nomeadamente siRNA e a proteína modelo BSA, nos exo-lipossomas.

Estes estudos foram efetuados como prova de conceito da aplicabilidade destes sistemas como veículos para terapia genética, usando a tecnologia emergente CRISPR-Cas9.

Mais uma vez, verificou-se que estes sistemas têm tamanhos entre os 120 e 150 nm, e uma carga superficial neutra ou ligeiramente negativa (Figuras 12 e 13). De modo a proporcionar uma leitura correta da Figura 12, esta mostra o tamanho e o potencial zeta de exo-lipossomas, com DODAP, encapsulando concentrações crescentes de siRNA (C1= $4.1 \times 10^{-6}$ M; C2= $5 \times 10^{-6}$ M; C3= $1 \times 10^{-5}$ M e C4= $2 \times 10^{-5}$ M). A imagem da esquerda mostra o tamanho (barras) e a polidispersividade (pontos), e a imagem da direita mostra p potencial zeta.

Similarmente, a figura 13 mostra o tamanho e potencial zeta de exo-lipossomas, com DODAP, encapsulando 5 e 10  $\mu$ g/mL de BSA. A

imagem da esquerda mostra o tamanho (barras) e a polidispersividade (pontos), e a imagem da direita mostra o potencial zeta.

Estes exo-lipossomas, quando encapsulando siRNA a concentrações de  $4.1 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  e  $2 \times 10^{-5}$  M, têm o mesmo tamanho do que os exo-lipossomas vazios, e uma carga ligeiramente negativa, tendo também polidispersividade baixa, por volta de 0.1, que indica que os seus tamanhos são muito homogêneos.

Verifica-se então que estes veículos têm características apropriadas para entrega de fármacos, além de elevadas eficiências de encapsulamento quer de siRNA (Tabela 2), quer de BSA a 10  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 3).

**Tabela 2.** Eficiência de encapsulamento de três concentrações diferentes de siRNA em exo-lipossomas com DODAP.

[siRNA] (M)	Eficiência de encapsulamento (%)
$2.5 \times 10^{-9}$	97.7
$5 \times 10^{-9}$	98.9
$4.1 \times 10^{-4}$	78.3

**Tabela 3.** Eficiência de encapsulamento de duas concentrações de BSA em exo-lipossomas sem DODAP.

[BSA] $\mu\text{g/mL}$	Eficiência de encapsulamento (%)
5	31.0
10	79.1

Em conjunção, estes resultados mostram que estes sistemas são muito apelativos como veículos para compostos tanto lipofílicos como hidrofílicos, para aplicações desde entrega

de fármacos para o tratamento de doenças de difícil cura, como o cancro e doenças neurológicas, a aplicações na indústria da alimentação e cosmética.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição de lipossomas miméticos de exossomas, caracterizados por se comportarem quer como exossomas, quer como lipossomas nanométricos funcionalizados, constituídos por:
  - pelo menos um composto bioativo, hidrofílico ou hidrofóbico,
  - pelo menos um polímero,
  - e pelo menos um lípido como veículo farmacêuticamente aceitável.
2. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por os compostos bioativos hidrofílicos serem selecionados do grupo de: açúcares, ácidos nucleicos, proteínas, doxorubicina, fenóis, moléculas fitoquímicas, entre outros, e os compostos bioativos hidrofóbicos serem selecionados do grupo de: curcumina, resveratrol, paclitaxel, entre outros.
3. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizados por as moléculas bioativas poderem ser sintéticas e uma mistura de compostos bioativos tanto naturais como sintéticos.
4. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizados por os compostos bioativos serem moléculas lipofílicas, como a curcumina, ou hidrofílicas como a albumina do soro bovino (BSA) e o pequeno RNA de interferência (siRNA).
5. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por o veículo farmacêuticamente aceitável ser selecionado do grupo de:

fosfolípidos, lípidos que não fosfolípidos, gangliosídeos, colesteróis e lípidos modificados, ou uma mistura deles.

6. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 5, caracterizados por os fosfolípidos poderem ser naturais ou sintéticos, como fosfatidilcolina (PC), fosfatidil glicerol, fosfatídeos, fosfatidil etanolamina (PE), fosfatidil serina (PS), fosfatidil inositol (PI), esfingomiéline (SM), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), cardiolípine, ou seus produtos hidrogenados, por exemplo, fosfatidilcolina hidrogenada de soja, ou uma mistura deles.
7. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 6, caracterizados por os fosfolípidos serem a dipalmitoilfosfatidilcolina e a esfingomiéline.
8. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 5, caracterizados por os colesteróis serem escolhidos de um grupo de ovino, bovino, ou derivado de plantas, entre outros.
9. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 8, caracterizados por o colesterol (Chol) usado ser o ovino.
10. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por o polímero hidrofílico ser selecionado de um grupo de polietilenoglicóis, poliglicéreis, polipropilenoglicóis, álcoois de polivinil, copolímero de anidrido estireno/maleico, polivinilpirrolidona, e poliamina ácida sintética.



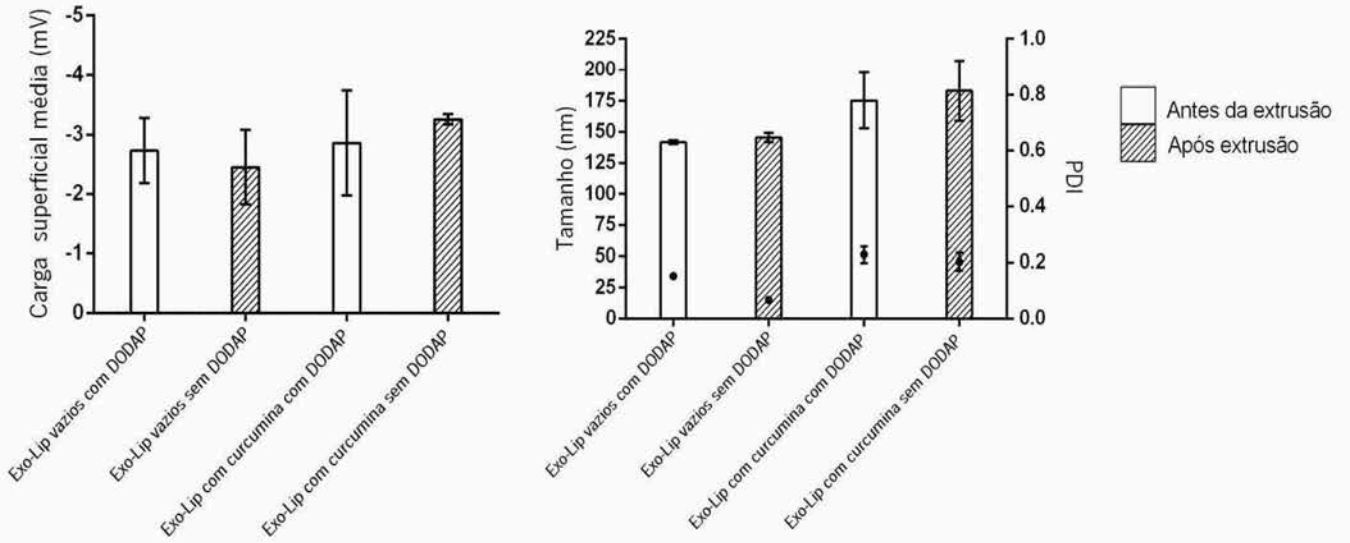
11. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 10, caracterizados por conterem na sua composição um lípido modificado com polietilenoglicol (PEG).
12. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 11, caracterizados por o lípido modificado com polietilenoglicol ser selecionado do grupo de 1,2-diestearoil-3-fosfatidiletanolamina-poliethilenoglicóis como os 1,2-diestearoil-3-fosfatidiletanolamina-PEG2000, 1,2-diestearoil-3-fosfatidiletanolamina-PEG5000, diestearoil glicerol-PEG2000 e N-palmitoil-esfingosina-1-{succinil[metoxi (polietilenoglicol)2000]} (PEG-Cer).
13. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com as reivindicações 1 a 12, caracterizados por também poderem conter na composição um lípido catiónico sintético como veículo farmacêuticamente aceitável.
14. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 13, caracterizados por o lípido sintético catiónico ser selecionado do grupo de 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), brometo de dioctadecildimetilamonio (DODAB), cloreto de dioctadecildimetilamonio (DODAC), 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) ou 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP).
15. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 5, caracterizados por o gangliosídeo ser selecionado do grupo de GM1, GM2 ou GM3.

16. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com as reivindicações 1 a 15, caracterizados por a composição incluir:
- 20 a 60% (mol/mol) de colesterol (Chol);
  - 15 a 40% (mol/mol) de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC);
  - 0 a 25% (mol/mol) de dioleoil dimetilamónio propano (DODAP);
  - 0 a 25% (mol/mol) de fosfatidilcolina (PC);
  - 0 a 25% (mol/mol) de fosfatidilserina (PS);
  - 5 a 25% (mol/mol) de esfingomiéline (SM);
  - 1 a 10% (mol/mol) de polietilenoglicol - ceramida (PEG-Cer);
  - 5 a 20% (mol/mol) de gangliosídeos e;
  - 5 a 40% de pelo menos um composto bioativo.
17. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizados por terem tamanhos entre os 30 e os 800 nm, preferencialmente entre 50 e 500 nm, mais preferivelmente entre os 80 e os 300 nm, e ainda mais preferencialmente entre os 80 e os 200 nm, e apresentando uma carga superficialmente neutra ou ligeiramente negativa.
18. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com as reivindicações 1 a 17, caracterizados por serem preparados pelos métodos da hidratação do filme lipídico, da injeção etanólica ou por microfluídica.
19. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com as reivindicações 1 a 18, caracterizados por serem administrados preferencialmente, mas não exclusivamente, por injeção intravenosa.
20. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com as reivindicações 1 a 19, caracterizados por serem

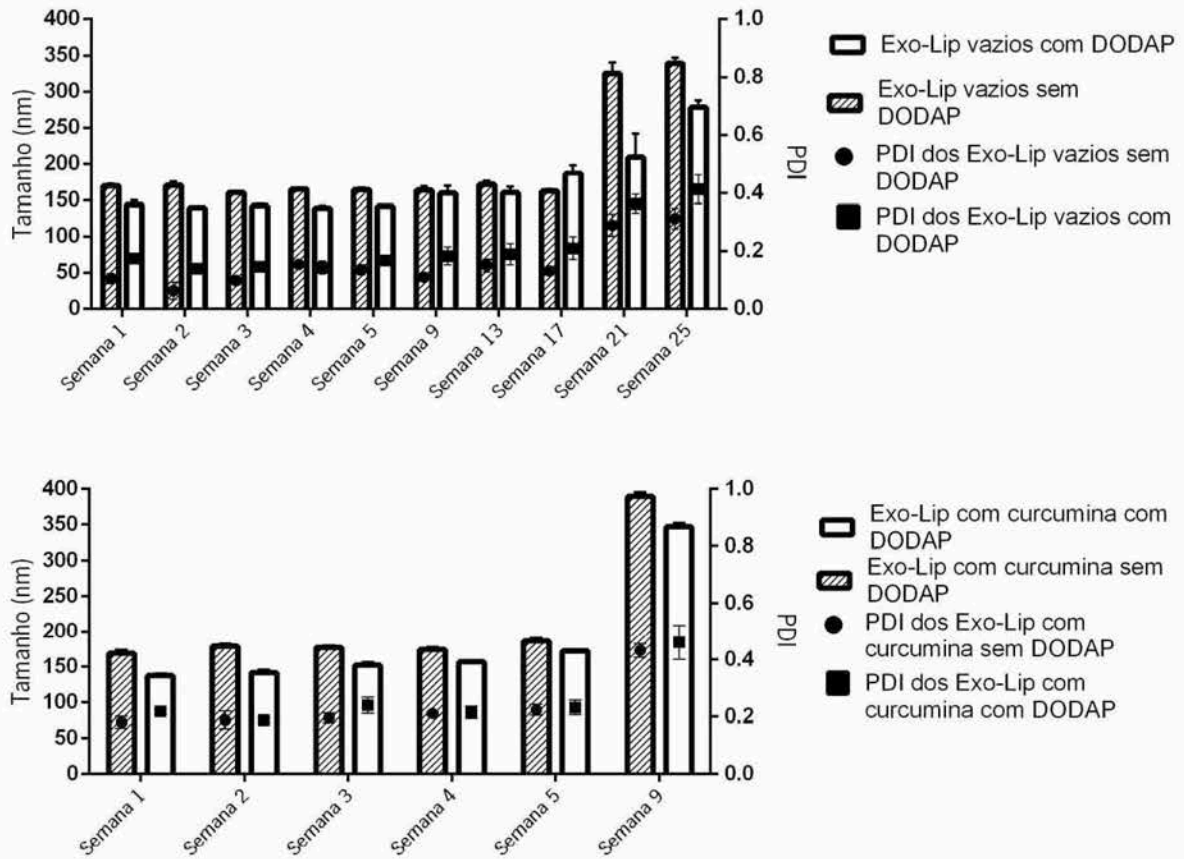
veículos para entrega de fármacos para o tratamento de doenças de difícil cura, como o cancro e desordens neurológicas, e nas indústrias da alimentação e cosmética.

21. Composição de lipossomas miméticos de exossomas de acordo com a reivindicação 1 a 19, caracterizados por serem usados na preparação de medicamentos para o tratamento de doenças de difícil cura, como o cancro e doenças neurológicas.

**FIGURAS**



**Figura 1**



**Figura 2**

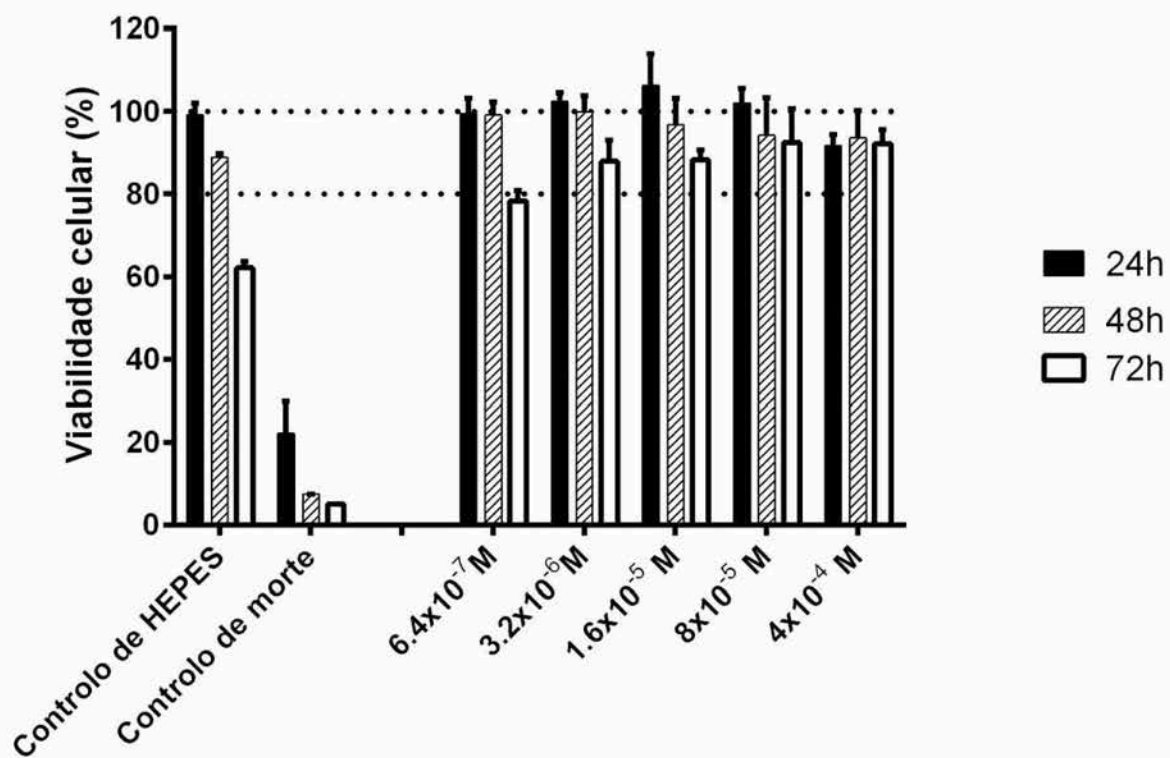


Figura 3

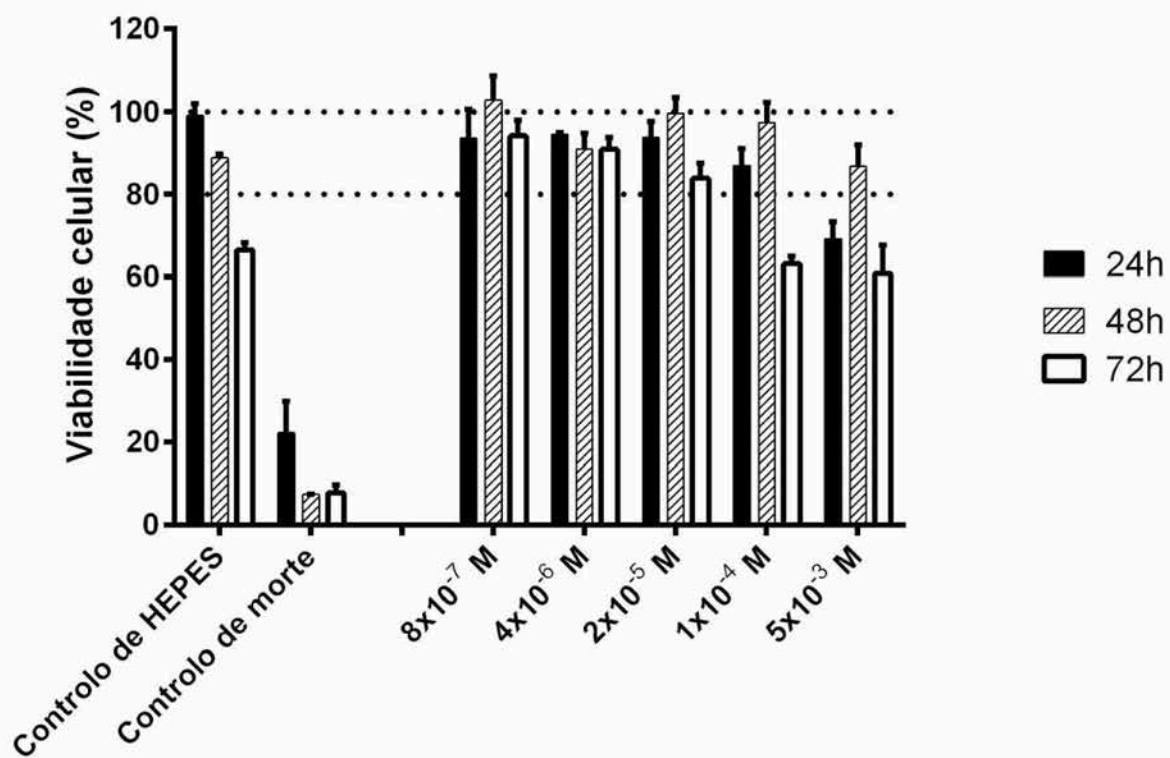


Figura 4

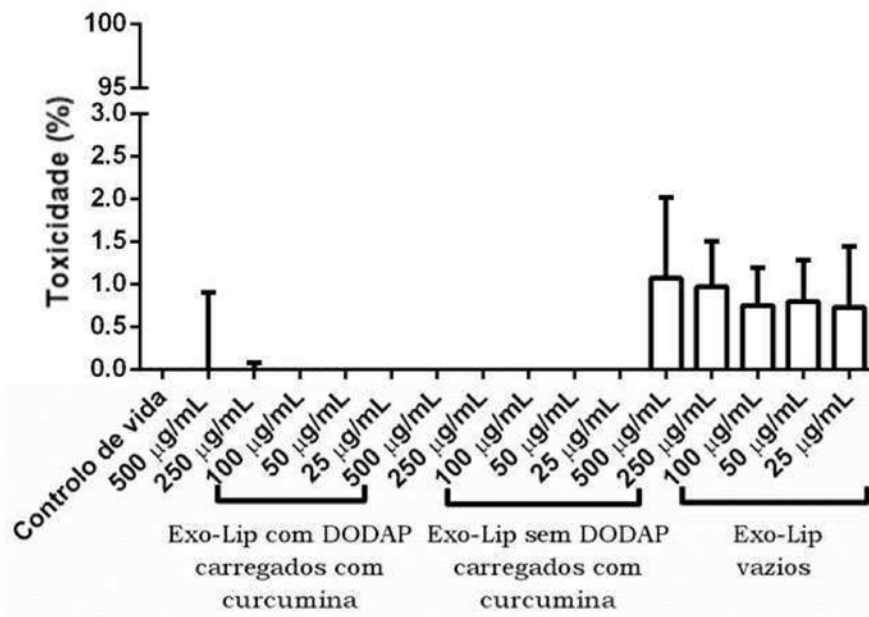


Figura 5

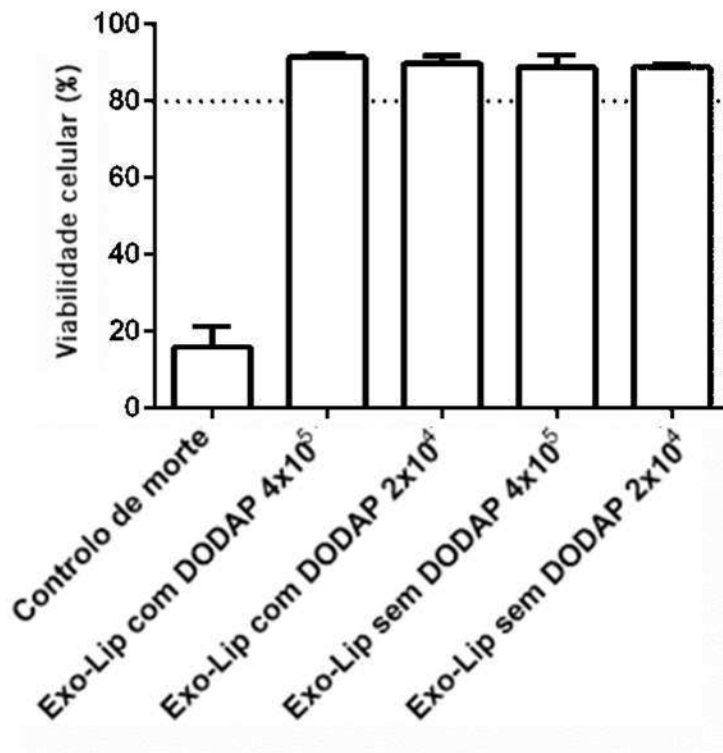
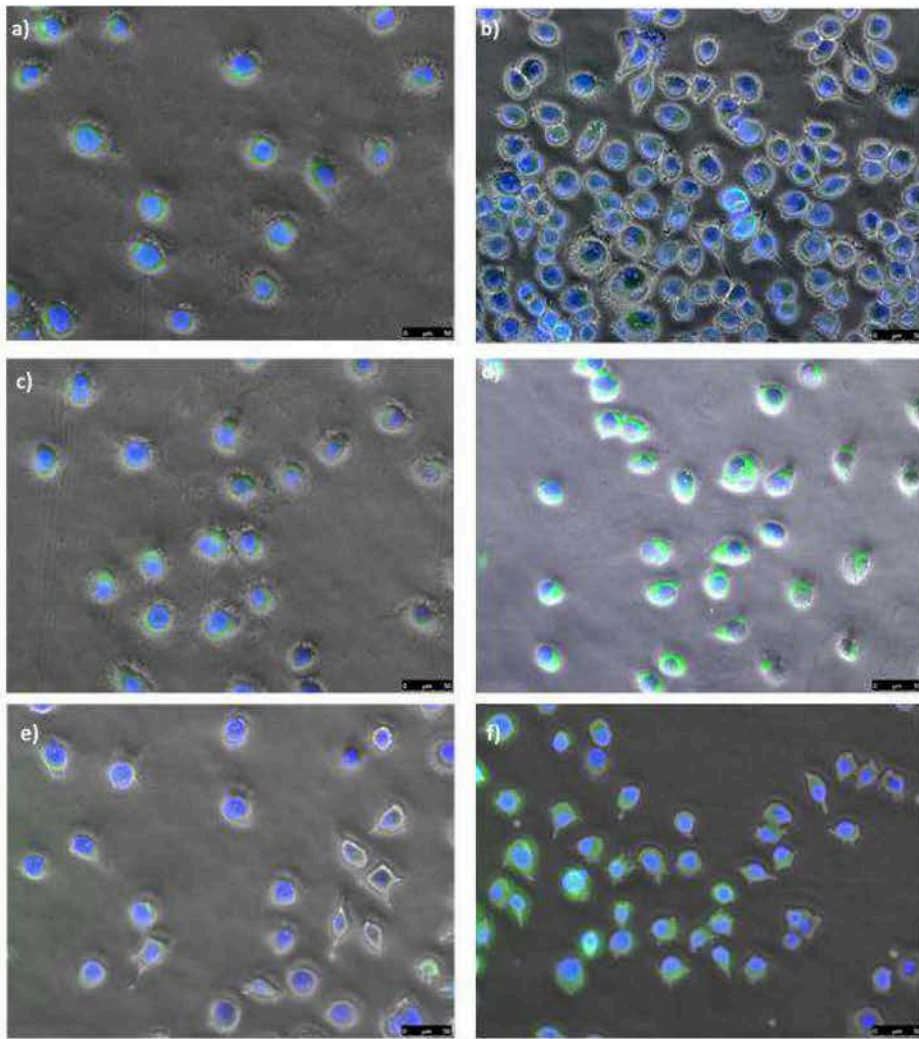
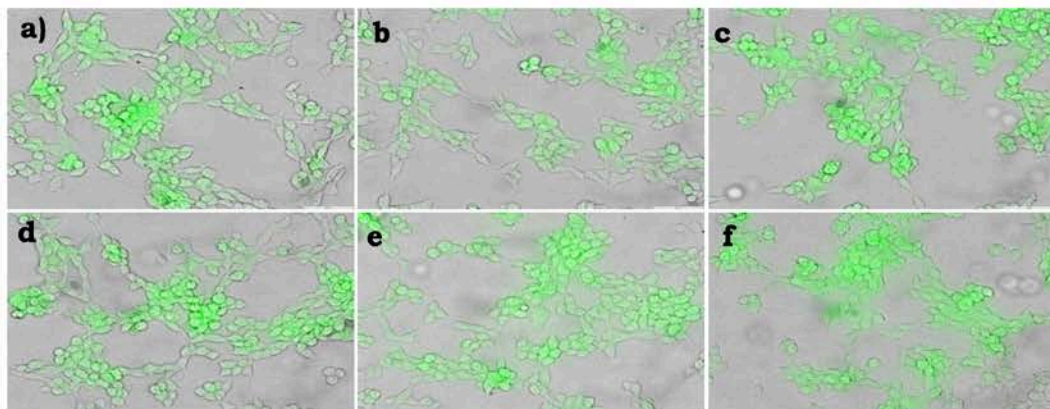


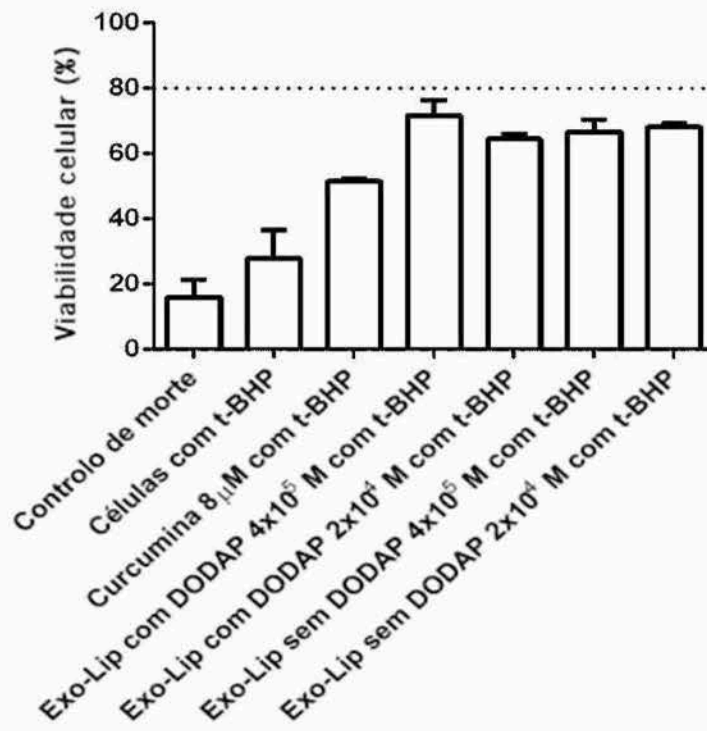
Figura 6



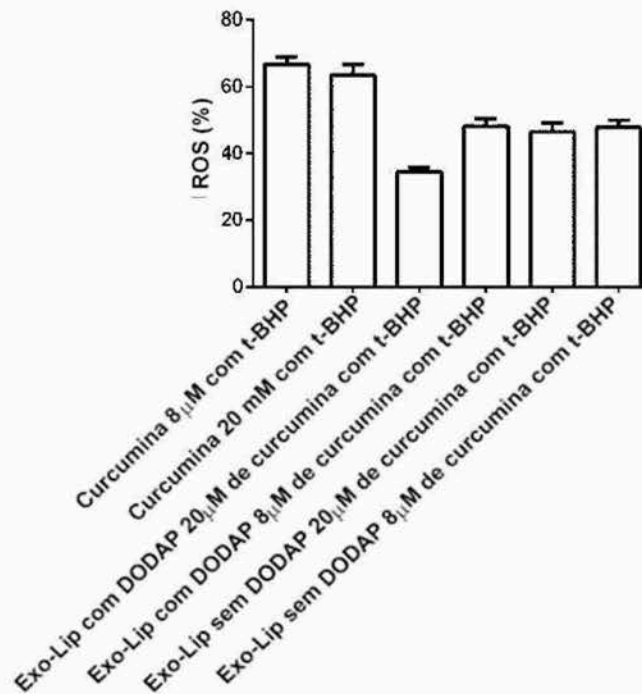
**Figura 7A**



**Figura 7B**

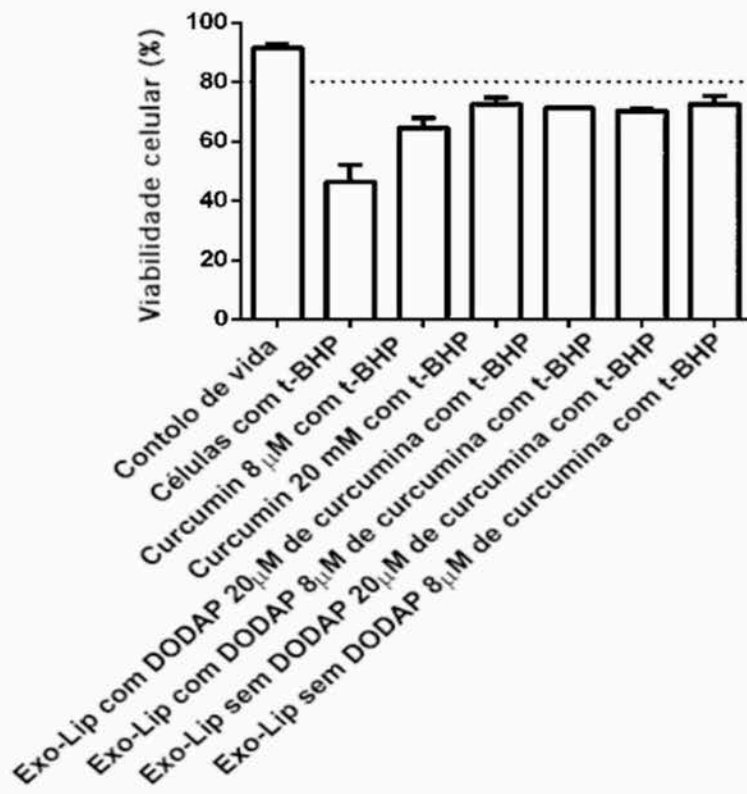


**Figura 8**



**Figura 9**



**Figura 10**

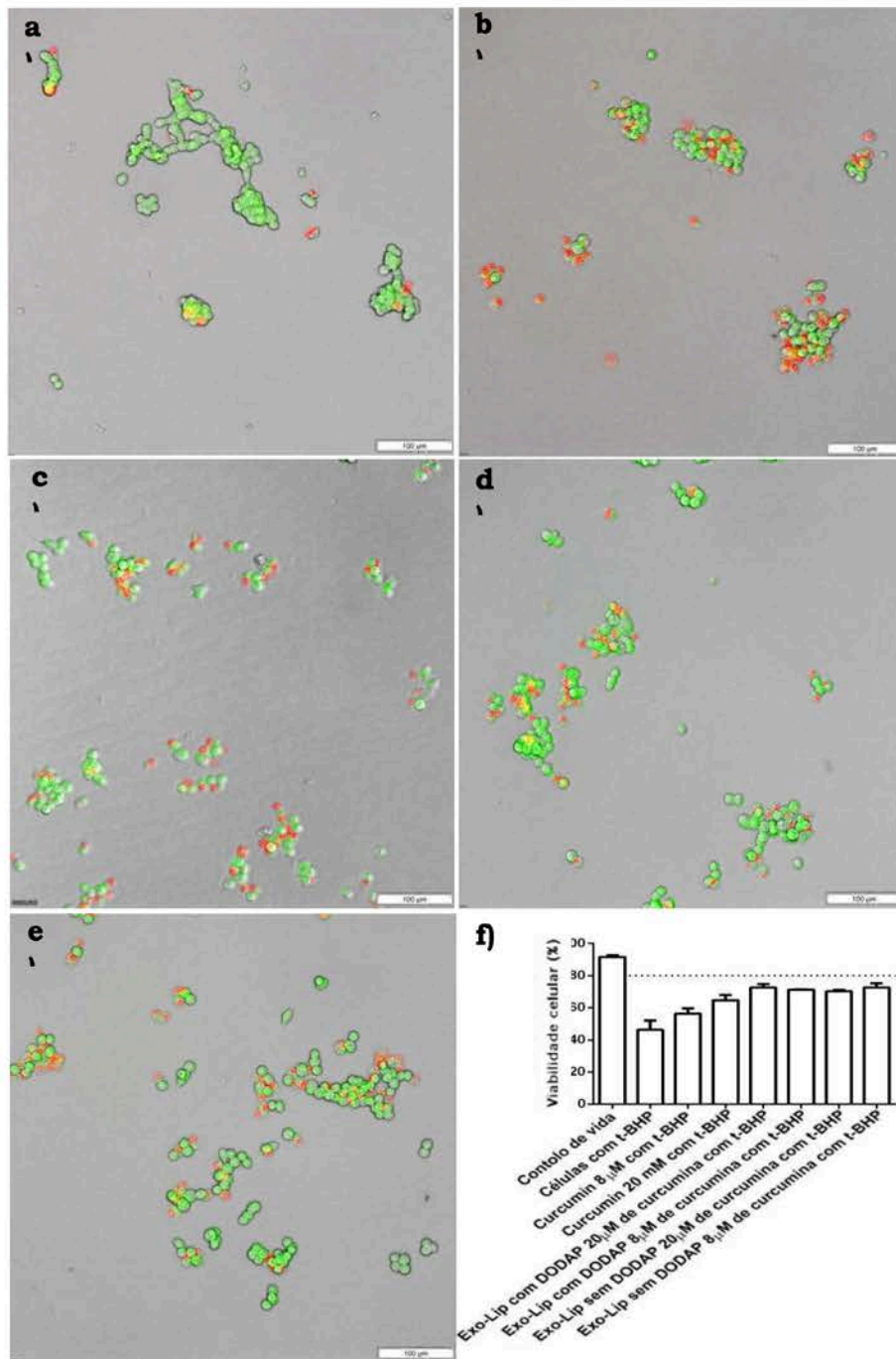


Figura 11

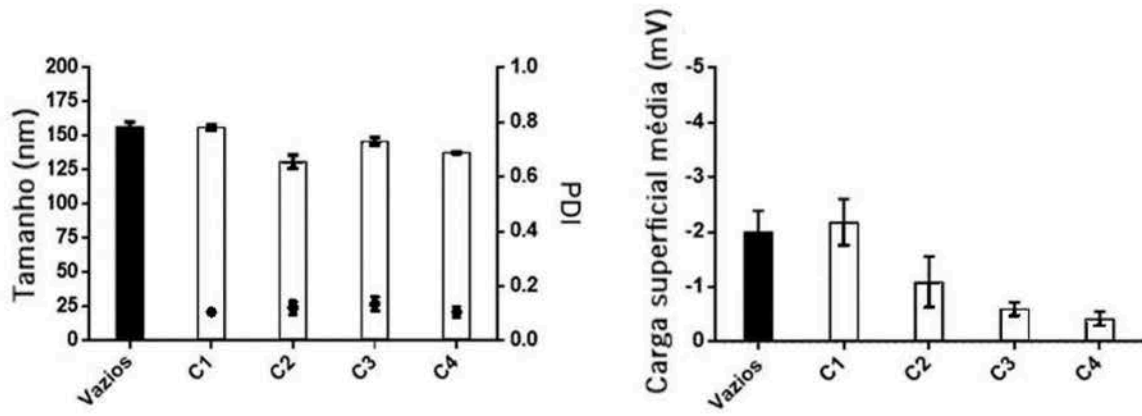


Figura 12

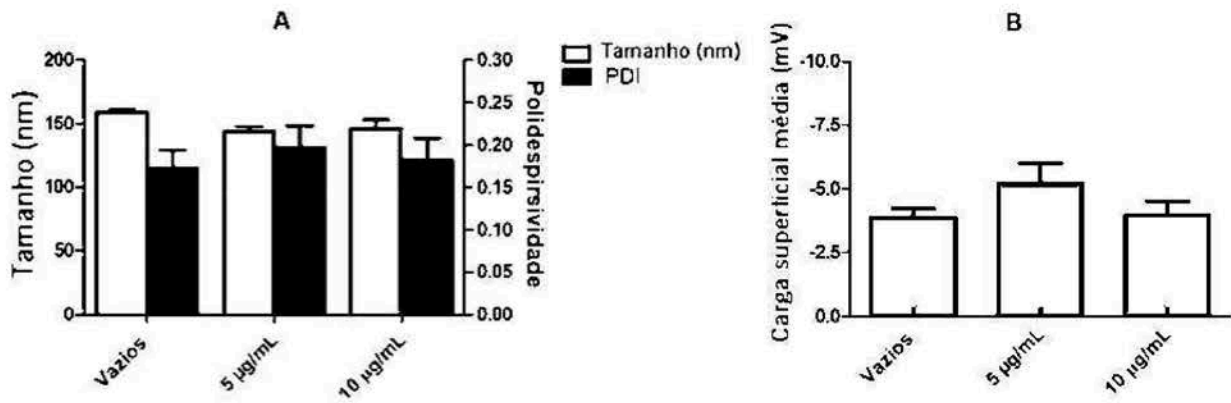


Figura 13