



IPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102024003355-8

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

(21) Número do Depósito: BR 102024003355-8

(22) Data do Depósito: 21/02/2024

(43) Data da Publicação Nacional: 18/02/2025

(51) Classificação Internacional: A61K 35/18.

(52) Classificação CPC: A61K 35/18.

(54) Título: MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E PLASMA HUMANO PARA PERFUSÃO DE FÁRMACOS E USOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA XV DE NOVEMBRO, 1299 - CENTRO, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80060-000, Brasileira

(72) Inventor: GLAUCIO VALDAMERI; VIVIAN ROTUNO MOURE VALDAMERI; JÚLIA DE PAULA DUTRA; MARCEL IVAN RAMIREZ ARAYA; IZADORA VOLPATO ROSSI.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 21/02/2024, observadas as condições legais

Expedida em: 15/07/2025

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

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

PATENTES
ICT

RELATÓRIO DESCRITIVO

MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E PLASMA HUMANO PARA PERFUSÃO DE FÁRMACOS E USOS.

BREVE DESCRIÇÃO

[001] Trata a presente solicitação de patente de invenção de “**MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E PLASMA HUMANO PARA PERFUSÃO DE FÁRMACOS E USOS**”, que se refere à obtenção de vesículas extracelulares de células sanguíneas e plasma humano e aos seus usos, tanto para perfusão de fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água, quanto na obtenção de composições farmacêuticas para perfusão de fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água. As vesículas obtidas a partir do método pleiteado, que compreende a utilização de equipamentos e reagentes fáceis de serem obtidos e com bom custo-benefício, são capazes de incorporar as moléculas dos fármacos e de distribuí-las de maneira adequada, permitindo sua solubilidade e estabilidade em ambientes aquosos para obtenção do fim terapêutico desejado, enquanto reduz efeitos adversos.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A presente invenção pertence à seção de necessidades humanas, ao campo de ciência médica ou higiene, mais especificamente, ao campo de composição preparações medicinais contendo materiais de constituição indeterminada ou seus produtos de reação, mais precisamente, sangue e plasma, por se referir a à obtenção de vesículas extracelulares de células sanguíneas e plasma humano e aos seus usos.

CONVENCIMENTO

[003] O câncer ocupa a segunda posição entre as doenças com maior mortalidade mundial. Em 2020, estimou-se que ocorreriam quase 10 milhões de mortes no mundo em decorrência dessa doença. A estimativa no Brasil para o triênio de 2023 a 2025

aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente, seguido dos cânceres de mama e próstata. Esse quadro é ainda agravado pela ocorrência de resistência a múltiplas drogas, cujo principal causador é a superexpressão de transportadores ABC (*ATP-binding Cassette*). Os transportadores ABC, ABCG2 e glicoproteína P (P-gp) são os principais responsáveis pelo efluxo de diversos quimioterápicos antineoplásicos.

[004] A expressão de transportadores ABC em diversos tipos de câncer é associada à diminuição da sobrevida do paciente oncológico. Nesse contexto, o desenvolvimento de inibidores dos transportadores ABC é urgente. Entretanto, testes clínicos com muitos dos inibidores identificados em sistema *in vitro* são inviabilizados devido as características desses compostos, normalmente pouco solúveis ou insolúveis em água.

[005] A incorporação de fármacos com baixa solubilidade ou insolubilidade em água em formulações farmacêuticas tradicionais é complexa e pode acarretar alguns problemas, tais como a liberação do fármaco no ambiente aquoso da circulação sanguínea e efeitos adversos durante sua passagem pelo trato gastrointestinal, já a utilização de solventes orgânicos (como é o caso do DMSO) em testes clínicos é vetada devido a sua toxicidade, o que dificulta ainda mais o desenvolvimento de novos carreadores.

[006] Surfactantes são frequentemente utilizados para aumentar a solubilização de fármacos lipofílicos (com afinidade a compostos gordurosos/lipídicos). Por exemplo, Cremophor, feito pela reação de óxido de etileno com óleo de rícino, tem sido utilizado para solubilizar fármacos insolúveis em água, tais como anestésicos, analgésicos, imunossupressores e antineoplásicos, como o paclitaxel (Taxol). Outro surfactante muito utilizado é o Tween 80 ou polissorbato 80 para solubilização de amiodarona, vitamina K, etoposídeo e docetaxel. Entretanto, tanto Cremophor quanto Tween 80 não são veículos inertes e tiveram efeitos colaterais, como reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade a eles atribuídos. Nesse contexto, é vislumbrado o emprego de vesículas extracelulares como sistema de entrega de drogas.

[007] Como solução para superação das deficiências identificadas no atual estado da técnica, a presente invenção disponibiliza uma metodologia para obtenção de vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células sanguíneas e plasma humano como

veículos para a entrega de drogas (*drug delivery*), bem como a incorporação da droga nas VEs e entrega as células. A fim de possibilitar o uso pré-clínico e clínico de compostos com relevante atividade biológica *in vitro*, porém, com característica físico-química de baixa solubilidade em água.

[008] A solução proposta é baseada no uso de equipamentos e reagentes de fácil obtenção, tais como: centrífuga, CaCl_2 , entre outros, para a obtenção de vesículas extracelulares humanas, e incorporação de ativos farmacêuticos a estas VEs, para posterior entrega da droga às células.

[009] As vesículas extracelulares (VEs) são estruturas carreadoras naturais e assim passaram a ser estudadas como novo arcabouço para *drug delivery*, com a vantagem de serem totalmente biocompatíveis, por serem de origem biológica. As VEs podem variar de acordo com a célula de origem, tamanho, morfologia e conteúdo de carga.

[010] A classificação das VEs pode estar dividida em dois grupos: exossomos e microvesículas. Quando liberadas através do brotamento externo da membrana plasmática das células de origem são denominadas de microvesículas e podem apresentar variação em seu tamanho, apresentando de 50 nm a 1 μm . Quando ocorre a formação de brotamentos internos da membrana endossomal ocorre a formação de corpos multivesiculados (MVBs), que são liberados pela fusão da membrana externa do MVB à membrana plasmática, nesse caso, elas são classificadas como exossomos e podem apresentar tamanho variando de 30 a 150 nm.

[011] Fisiologicamente, VEs desempenham um papel importante na comunicação intercelular através da transferência de carga biológica. As VEs podem exercer seus efeitos em processos biológicos fundamentais de maneira pleiotrópica, ativando diretamente os receptores de superfície celular por meio de proteínas e ligantes lipídicos bioativos, fundindo seu conteúdo de membrana na membrana plasmática de células receptoras e entregando efetores, incluindo proteínas, fatores de transcrição, lipídios e fosfolipídios, RNAs reguladores não codificantes como microRNAs (miRNAs), mRNAs e partículas infecciosas. A comunicação entre células é de grande importância para todos os organismos multicelulares. Essa troca de informações não está limitada a

secreção de fatores solúveis ou interação direta em processos celulares normais, mas pode ocorrer em processos patológicos.

[012] Adicionalmente, o processo de vesiculação pode ser induzido. Esse processo não é completamente esclarecido, entretanto, estudos indicam que a elevação na concentração de cálcio citoplasmático, associada ao deslocamento do equilíbrio na simetria dos fosfolipídeos da membrana plasmática desempenham papel fundamental nesse processo. A vesiculação leva a formação de vesículas estruturalmente caracterizadas por uma bicamada lipídica constituída por esfingomielina, fosfatidilserina e outros fosfolipídios. Intercalados com esses fosfolipídeos temos proteínas de membrana, de adesão e colesterol.

[013] Nesse contexto, a presente invenção se refere à obtenção de vesículas extracelulares de células sanguíneas e plasma humano e ao seus usos, tanto para perfusão de fármacos e/ou ativos pouco solúveis ou insolúveis em água, quanto para obtenção de composições farmacêuticas para perfusão de fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água. As vesículas obtidas a partir do método pleiteado, que compreende a utilização de equipamentos e reagentes fáceis de serem obtidos e com bom custo-benefício, são capazes de incorporar as moléculas dos fármacos e de distribuí-las de maneira adequada, permitindo sua solubilidade e estabilidade em ambientes aquosos para obtenção do fim terapêutico desejado, enquanto reduz efeitos adversos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[014] Atualmente, estão disponíveis no estado da técnica anterioridades que se referem a vesículas extracelulares e seu emprego no campo da saúde. No entanto, nenhuma delas antecipa o processo e usos das vesículas obtidas a partir do processo pleiteado, o qual emprega equipamentos e reagentes fáceis de serem obtidos e com bom custo-benefício, disponibilizando vesículas capazes de incorporar as moléculas de fármacos e/ou ativos insolúveis ou pouco solúveis em água, e de distribuí-las de maneira adequada, permitindo sua solubilidade e estabilidade em ambientes aquosos, alcançando-se o fim terapêutico desejado, enquanto reduz efeitos adversos.

[015] Cabe destacar que a presente invenção se refere a vesículas extracelulares obtidas de células sanguíneas, por meio de estímulo com CaCl_2 , além de VEs obtidas diretamente do plasma, como alternativa mais rápida e barata. No método pleiteado, é empregada incubação para a incorporação de drogas/ativos hidrofóbicos nas vesículas, a fim de utilizá-las como um sistema de entrega, o que não é antecipado pelas anterioridades, conforme observado a seguir.

[016] A anterioridade BR112018075295-9, intitulada "Vesículas extracelulares derivadas de lisado de plaquetas humanas para uso em medicina", refere-se a lisado de plaquetas humanas ou uma fração que é enriquecida em vesículas extracelulares derivadas de lisado de plaquetas humanas, obtido por meio de congelamento e descongelamento, e seu uso em medicina, particularmente para a prevenção e/ou tratamento de doenças inflamatórias, doenças neurodegenerativas, doenças imunes/autoimunes, doenças cardiovasculares, doenças dermatológicas, doenças ortopédicas, medicina regenerativa de tecido, doenças oncológicas, doenças infecciosas, rejeições de transplante, acidente vascular encefálico, isquemia ou doença enxerto-versus-hospedeiro. A anterioridade ainda descreve um método de fabricação de uma preparação farmacêutica ou uma preparação de diagnóstico ou uma preparação cosmética compreendendo a etapa de adição de lisado de plaquetas humanas que é enriquecido em vesículas extracelulares derivadas de lisado de plaquetas humanas à preparação farmacêutica ou uma preparação de diagnóstico ou uma preparação cosmética. Cabe destacar que a anterioridade prevê o uso de VEs em formulações cosméticas, sem incorporação de um ativo específico, mas para recuperar fatores de crescimento naturais tais como: PDGF, VEGF, FGF, EGF e TGF, a fim de ajudar a regenerar matriz extracelular enrugada e danificada. Além disso, diferentemente da anterioridade mencionada, que utilizam fatores já contidos naturalmente nas vesículas.

[017] A anterioridade BR112020013131A2, intitulada "Exossomos para imunooncologia e terapia anti-inflamatória", refere-se a vesículas extracelulares compreendendo um componente imunomodulador e métodos para produzir as vesículas extracelulares e métodos para usar as vesículas extracelulares para tratar

câncer, GVHD e doenças autoimunes. Cabe ressaltar que, diferentemente da anterioridade, na qual os inventores utilizam células, em cultivo, modificadas com o componente imunomodulador, para obter a partir destas células, VEs expressando estes componentes de interesse, a presente invenção emprega incubação para a incorporação de ativos hidrofóbicos nas vesículas, a fim de utilizá-las como um sistema de entrega.

[018] A anterioridade US8329161B2, intitulada "*Redbloodcell-derived vesicles as a nanoparticle drug delivery system*", refere-se ao uso de vesículas derivadas de glóbulos vermelhos (RDV), obtidas a partir da estimulação de eritrócitos com CaCl_2 e EDTA, como um sistema de entrega de drogas de nanopartículas. Para obtenção dos sistemas, as vesículas e a solução contendo as substâncias foram encapsuladas com incubação com 100uL de tampão hiposmótico de lise por 1h a 40 °C. O produto dsDNA foi amplificado por PCR. Portanto, a anterioridade emprega as VEs para incorporação da substância de interesse, para posteriormente extrair um produto e amplificá-lo por PCR, diferentemente da presente invenção que descreve a incorporação de ativos hidrofóbicos nas vesículas, a fim de utilizá-las como sistema carreador.

[019] A anterioridade PT2019123259B, intitulada "Hidrogéis produzidos a partir de componentes do plasma sanguíneo, processos e suas aplicações", diz respeito materiais para produção de hidrogéis que compõe uma matriz polimérica composta por componentes do plasma sanguíneo, nomeadamente plasma rico em plaquetas (PRP) e/ou lisado de plaquetas (PL) que são bioativos e apresentam propriedades mecânicas ajustáveis. A anterioridade ainda descreve um processo de produção de hidrogéis à base de plasma sanguíneo, que demonstrem uma maior estabilidade quando comparados com os hidrogéis e selantes derivados de plaquetas e fibrina e do estado da arte. A presente invenção se refere a obtenção de VEs para a incorporação de drogas, e posterior entrega dessas drogas às células no organismo humano. Dado que a anterioridade se refere a um processo para a obtenção de hidrogéis a partir do plasma sanguíneo, ela não antecipa a produção de VEs.

[020] A anterioridade US2022033051, intitulada "*Methods for the preservation of reagent red blood cells using carbon monoxide*", refere-se ao campo da

determinação do grupo sanguíneo e à preparação de reagentes contendo glóbulos vermelhos melhorados para uso na tipagem sanguínea do sangue antes de seu uso na medicina transfusional. A anterioridade também se refere ao armazenamento aprimorado e circulação *in vivo* de glóbulos vermelhos para administração de drogas. Diferentemente da invenção descrita no presente pedido, a anterioridade buscou preparar reagentes contendo glóbulos vermelhos para melhorar o seu uso em exames de tipagem sanguínea, bem como aprimorar a técnica de armazenamento dos glóbulos vermelhos.

[021] Além das anterioridades patentárias, também estão presentes no atual estado da técnica, publicações científicas relacionadas ao tema, mas que não antecipam o pleiteado na presente invenção, conforme observado a seguir.

[022] Kuo e colaboradores (2017: *Redbloodcells: a source of extracellular vesicles*) investigaram uma maneira de estimular a formação de VEs derivadas de hemácias, por meio de desencadeamento da via alternativa de ativação do complemento, através da adição do fator de veneno de cobra na ausência ou presença do quelante de cálcio EGTA.

[023] Usman e colaboradores (2018: *Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles*) utilizaram VEs produzidas a partir de hemácias humanas, obtidas do sangue do grupo O de doadores saudáveis e tratadas com ionóforo de cálcio, para entrega de RNAs terapêuticos, sendo ideal para tratamentos universais. Para tanto, as VEs foram eletroporadas e carregadas com ASOs anti-miR-125b.

[024] Malhotra e colaboradores (2019: *Red blood cells-derived vesicles for delivery of lipophilic drug camptothecin*), utilizaram VEs derivadas de hemácias ou eritrócitos humanos, seguindo hemólise, selagem e extrusão dos eritrócitos, para posterior incubação das VEs com a droga hidrofóbica camptotecina. A presente invenção se refere a obtenção de vesículas extracelulares a partir de duas amostras humanas: (1) de células sanguíneas (incluindo hemácias, mas também leucócitos e plaquetas), obtidas por meio de estímulo com CaCl_2 e; (2) diretamente de plasma, como uma

alternativa mais rápida e barata, além de se poder utilizar o plasma do próprio paciente para este procedimento.

[025] Yang e colaboradores (2022: *Roles and applicationsofredbloodcell-derivedextracellularvesicles in healthanddiseases*), em sua revisão, descrevem o uso de VEs em diversas aplicações na área de saúde. Entretanto, o autor relata o uso dessas vesículas derivadas de hemácias. Na presente invenção, é descrita a obtenção de vesículas extracelulares de células sanguíneas por meio de estímulo com CaCl_2 , mas também são apresentadas VEs obtidas diretamente do plasma, como uma alternativa mais rápida e barata.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[026] A presente invenção tem como objetivo disponibilizar vesículas extracelulares de células sanguíneas e plasma humano a serem empregadas para perfusão de fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água, e na obtenção de composições farmacêuticas para perfusão de fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água a partir de um processo que emprega equipamentos e reagentes fáceis de serem obtidos e com bom custo-benefício.

DA INVENÇÃO

[027] A presente invenção se refere a um processo de obtenção de VEs partir de células sanguíneas e de plasma, por meio de estímulo com CaCl_2 , e aos seus usos, tanto para perfusão de fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água, quanto para obtenção de composições farmacêuticas para perfusão de fármacos e/ou ativos pouco solúveis ou insolúveis em água. As vesículas obtidas a partir do método pleiteado, que compreende a utilização de equipamentos e reagentes fáceis de serem obtidos e com bom custo-benefício, são capazes de incorporar as moléculas de fármacos hidrofóbicos, por meio de incubação, e de distribuí-las de maneira adequada, permitindo sua solubilidade e estabilidade em ambientes aquosos para obtenção do fim terapêutico desejado, enquanto reduz efeitos adversos.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[028] A presente invenção apresenta como principais vantagens:

[029] Disponibilizar um processo de obtenção de VEs a partir de células sanguíneas e de plasma a serem empregadas em sistemas de entrega de ativos, que emprega equipamentos e reagentes fáceis de serem obtidos e com bom custo-benefício, sendo, portanto, uma técnica simples e de fácil reprodução;

[030] Disponibilizar VEs capazes de incorporar as moléculas de fármacos e/ou ativos pouco solúveis ou insolúveis em água, por meio de incubação, e de distribuí-las de maneira adequada, permitindo sua solubilidade e estabilidade em meios aquosos para obtenção do fim terapêutico desejado, enquanto reduz efeitos adversos.

DESCRIÇÃO DA FIGURA

[031] A fim de possibilitar melhor o entendimento da presente invenção, será feita referência à figura descrita a seguir:

[032] FIG. 1: Gráficos em barra das porcentagens de inibição do efluxo de substratos mediado pelos transportadores ABCG2 e P-gp. Onde: (A) Inibição do transportador ABCG2 usando a cromona 4a incorporada nas VEs de células sanguíneas nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M; (B) Inibição do transportador ABCG2 usando a cromona 4a incorporada em VEs do plasma nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M; (C) Inibição do transportador P-gp usando o elacridar incorporado em VEs de células sanguíneas nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M; (D) Inibição do transportador P-gp usando o elacridar incorporado em VEs do plasma nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M. A condição controle (Ctrl) corresponde aos inibidores de referência (Ko143 para ABCG2 e elacridar para P-gp). Todos os sobrenadantes também foram avaliados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[033] A presente invenção se refere a obtenção vesículas extracelulares de células sanguíneas e plasma humano como um novo sistema de *drug delivery* e para formulação de composições farmacêuticas. O processo de obtenção das vesículas extracelulares de células sanguíneas e plasma se dá por meio de uma metodologia simples baseada na centrifugação e incorporação de fármacos, insolúveis ou pouco solúveis em água, em temperatura ambiente, com posterior entrega dos fármacos e/ou ativos para células.

[034] Além do processo de obtenção das VEs, a presente invenção ainda se refere ao uso das vesículas extracelulares de células sanguíneas e plasma humano para perfusão de fármacos ou ativos pouco solúveis ou insolúveis em água e do uso das vesículas extracelulares de células sanguíneas e plasma humano para obtenção de composições farmacêuticas para perfusão de fármacos ou ativos pouco solúveis ou insolúveis em água.

[035] Para o preparo das VEs, foram coletados 9 mL de sangue em tubo contendo EGTA (anticoagulante), numa concentração final de 8 mM. O sangue foi centrifugado a 425 x *g*, por 10 minutos, a fim de se separar o plasma das células sanguíneas. O plasma foi armazenado em um tubo Falcon de 15 mL (aproximadamente 4 mL), enquanto as células foram adicionalmente processadas em meio RPMI, numa proporção de 1:1, (mesma quantidade de volume, aproximadamente 5 mL), sendo o material novamente centrifugado em 425 x *g*, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspendido com 5 mL de meio RPMI contendo 2 mM de CaCl₂ e, em seguida, incubado por uma hora a 37 °C, antes de ser novamente centrifugado a 425 x *g*, por 10 minutos. Após esse período, alíquotas de 1 mL de plasma, obtido anteriormente e armazenado, juntamente com sobrenadante obtido após a última centrifugação foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf e centrifugados a 4000 x *g*, por 30 minutos a 10 °C; após essa centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novos tubos que foram submetidos a última etapa de centrifugação, a 11000 x *g*, por 120 minutos a 10 °C, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as vesículas solubilizado em 60 µL de PBS, estando as VEs prontas para serem empregadas, a partir da incorporação dos ativos de interesse.

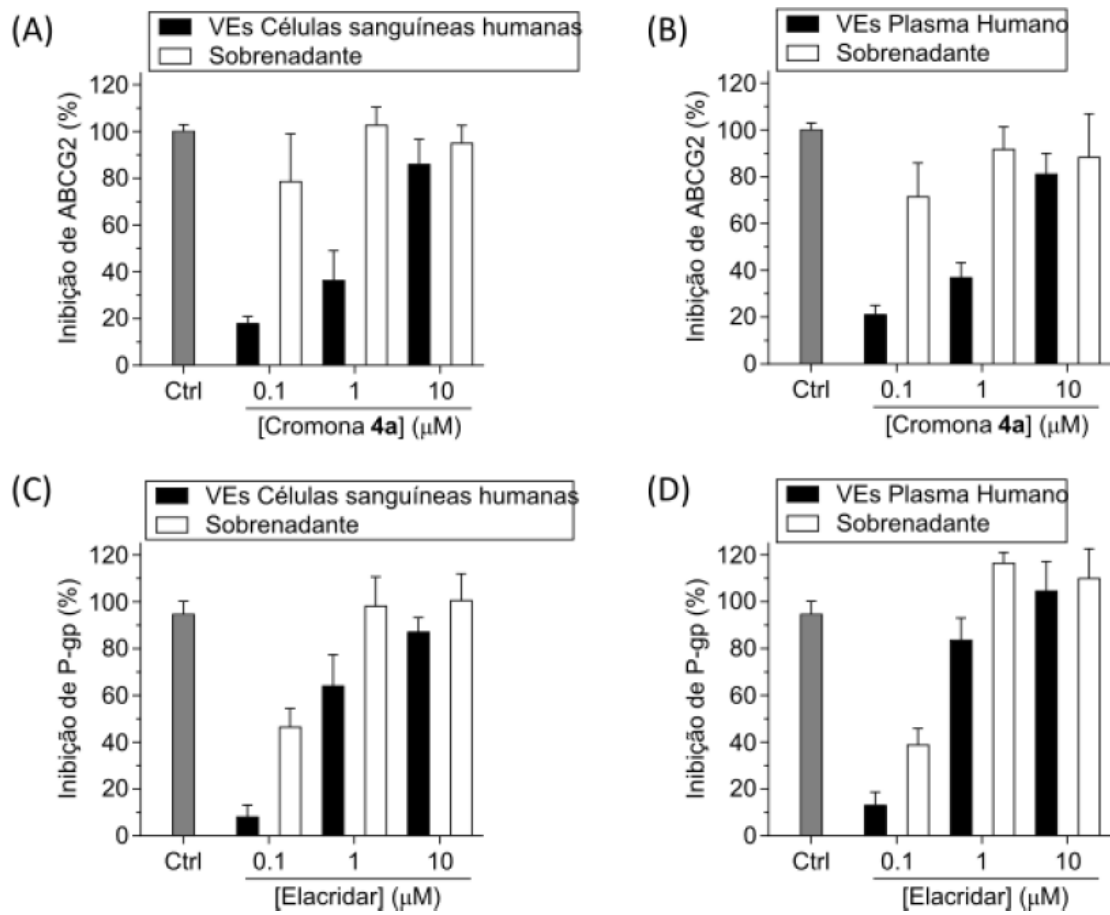
[036] A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford, que determina a quantidade de proteínas totais pela interação com o corante de Coomassiebrilliant blue G250. A absorvância máxima da solução ácida do corante muda de 495 nm para 595 nm quando ocorre a ligação com proteínas. Foi utilizada uma curva padrão variando a concentração de albumina de soro bovino (BSA) de 0 a 30 µg/mL. Os valores de absorvâncias foram obtidos através de um leitor de microplaca (Bio-Rad – iMark). A concentração da amostra foi determinada através da curva padrão.

[037] Para os ensaios de inibição, cujos resultados são observados na Figura 1, 10 µL (proveniente do pellet suspenso em 60 µL de PBS) de VEs obtidas de células sanguíneas e do plasma foram diluídos com PBS para um volume final de 200 µL. As vesículas foram incubadas com o inibidor (cromona 4a ou elacridar) por 30 minutos a temperatura ambiente, seguido por centrifugação a 11000 x g, por 120 minutos a 10 °C. O pellet de VEs contendo o inibidor incorporado foi ressuspensionado em 50 µL de PBS. As VEs contendo os inibidores (50 µL) foram utilizadas para o tratamento das células HEK293-ABCG2 e NIH3T3-Pgp (suspensão de 1×10^5 células em 250 µL de meio DMEM alta glucose), concomitantemente com os respectivos substratos de cada transportador (rodamina 123 para P-gp e hoechst 33342 para ABCG2), por 45 minutos a 37 °C. Um controle positivo (inibidor não incorporado as VEs) também foi testado. Em paralelo, as células também foram tratadas com o sobrenadante contendo o inibidor (aproximadamente 200 µL). Após tratamento, as células foram centrifugadas a 425 x g, por 5 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 300 µL de PBS para leitura da fluorescência em citometria de fluxo (FACS Celesta). Os dados foram analisados pelos programas FlowJo version X e Graphpad Prism version 6.01.

REIVINDICAÇÕES

1. **MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E PLASMA HUMANO PARA PERFUSÃO DE FÁRMACOS** caracterizado por se iniciar com a coleta e disposição de 9mL sangue em tubo contendo anticoagulante EGTA, numa concentração final de 8 mM; seguida da centrifugação do volume de sangue a 425 x g, por 10 minutos, para separação do plasma das células sanguíneas, sendo o plasma armazenado em um tubo Falcon e reservado, enquanto as células são processadas em meio RPMI, numa proporção de 1:1; em seguida, as células processadas em meio RPMI são novamente centrifugadas a 425 x g, por 10 minutos e o sobrenadante resultante é descartado, enquanto o pellet de células é ressuspensionado com 5 mL de meio RPMI contendo 2 mM de CaCl₂; em seguida, as células são incubadas por uma hora a 37 °C, antes de serem novamente centrifugadas a 425 x g, por 10 minutos; após esse período, alíquotas de 1 mL de plasma, obtido anteriormente e armazenado, juntamente com sobrenadante obtido após a última centrifugação são transferidos para tubos tipo Eppendorf e centrifugados a 4000 x g, por 30 minutos a 10 °C; após essa centrifugação, o sobrenadante é transferido para novos tubos que são submetidos a última etapa de centrifugação, a 11000 x g, por 120 minutos a 10 °C, em seguida, o sobrenadante é descartado e o pellet contendo as vesículas é solubilizado em 60 µL de PBS, estando prontas para serem empregadas a partir da incorporação dos ativos de interesse.
2. **USO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E PLASMA HUMANO PARA PERFUSÃO DE FÁRMACOS**, obtidas a partir do método descrito na reivindicação 1, caracterizado por ser para perfusão de fármacos e/ou ativos pouco solúveis ou insolúveis em água.
3. **USO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E PLASMA HUMANO PARA PERFUSÃO DE FÁRMACOS**, obtidas a partir do método descrito na reivindicação 1, caracterizado por ser para obtenção de

composições farmacêuticas para perfusão de fármacos e/ou ativos pouco solúveis ou insolúveis em água.

DESENHOS**FIG. 1**