

Stałe nanocząstki lipidowe stabilizowane fosfatydylocholiną oraz sposób ich wytwarzania

Przedmiotem wynalazku są stałe nanocząstki lipidowe stabilizowane fosfatydylocholiną, które mogą znaleźć zastosowanie w formulacjach kosmetycznych oraz farmaceutycznych jako nośniki hydrofobowych związków aktywnych.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania stałych nanocząstek lipidowych stabilizowanych fosfatydylocholiną.

Koloidalne systemy dostarczania leków, takie jak stałe nanocząsteczki lipidowe (SLN) oraz nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC), od kilku dekad zyskują coraz większe zainteresowanie. W sensie fizykochemicznym są to cząstki lipidowe zdyspergowane w wodzie i stabilizowane dodatkiem środków powierzchniowo czynnych (surfaktantów). Charakteryzują się one kulistym kształtem, dużym stosunkiem pola powierzchni do objętości oraz rozmiarami w zakresie od 50 do 1000 nm. Ich głównymi zaletami jest: brak toksyczności względem organizmów żywych, zwiększenie biodostępności hydrofobowych związków aktywnych, których są nośnikami, ukierunkowanie działania oraz selektywności tych związków pozwalające ograniczyć ich możliwe skutki uboczne i negatywne oddziaływanie na komórki zdrowe. Dodatkowo enkapsulacja związku aktywnego umożliwia jego kontrolowane uwalnianie oraz ochronę przed degradacją wynikającą z działania czynników środowiska, takich jak: tlen, światło czy wilgoć. Tego typu nośniki lipidowe mogą więc być wykorzystywane w opracowywaniu terapii celowanej. (S. M. Pyo i inni, Müller, Encapsulation by nanostructured lipid carriers. In Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries, 2017, 114-137).

Dokumenty US5250236(A1) oraz EP605497(B2) ujawniają pierwszą generacją lipidowych nanonośników leków jakimi są stałe nanocząstki lipidowe (SLN), które opracowane zostały jednocześnie przez

dwie grupy badawcze. SLN składają się z lipidowego rdzenia o strukturze krystalicznej, który pozostaje stały w temperaturze pokojowej oraz temperaturze ciała. Opracowanie tego typu nośników było odpowiedzią na wady dotychczas stosowanych formułacji na bazie nanoemulsji, wynikające z dużej mobilności (dyfuzji) enkapsulowanego związku z lipidu ciekłego do fazy wodnej. Zastosowanie stałego lipidu o dużej lepkości pozwoliło na ograniczenie procesu dyfuzji, jednakże z uwagi na niską rozpuszczalność związków aktywnych w lipidach stałych, wynikającą z wysokiego stanu uporządkowania rdzenia krystalicznego, zdolność załadunku jest ograniczona, jak również możliwe jest szybsze jego wypieranie podczas długotrwałego przechowywania w wyniku zmian polimorficznych struktury lipidu.

Podstawowymi składnikami formułacji lipidowych nanocząsteczek jest faza dyspersyjna – woda lub jednorodna mieszanina wody i rozpuszczalników organicznych, która stanowi od 70 do nawet 99%. Składnikami fazy zdyspergowanej, w której zamykany jest związek aktywny są związki niepolarne - lipidy, takie jak: woski, mono-, di- lub trójglicery średnio lub długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, wolne kwasy tłuszczowe, alkohole tłuszczowe czy steroidy (np. cholesterol). Stanowią one zwykle od kilku do kilkunastu procent składu formułacji. Większość z lipidowych komponentów nanocząstek SLN posiada status GRAS (z ang. *Generally Recognised As Safe*) co oznacza, że są one nietoksyczne dla organizmów żywych. Najczęściej wykorzystywanymi lipidami stałymi do produkcji nanocząstek lipidowych są: trimirystynian oraz tristearynian glicerolu, monobehenian, monostearynian lub monopalmitynian glicerolu, kwas stearynowy, palmitynowy, behenowy, palmitynian cetylu, alkohol stearynowy lub cetylowy (S. U. Rawal i M. M. Patel, *Lipid nanoparticulate systems. Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*, 2018, 49–138).

Surfaktanty i emulgatory w swojej budowie posiadają hydrofilową głowę oraz hydrofobowy ogon. Dzięki swojej amfipatycznej budowie

powodują obniżenie napięcia powierzchniowego pomiędzy dwoma niemieszającymi się fazami – fazą wodną oraz lipidem. Odgrywają dzięki temu dwie bardzo ważne role: ułatwiają dyspergowanie roztopionego lipidu w fazie wodnej, co jest niezbędne do wytworzenia odpowiednio małych cząstek oraz stabilizują nanocząstki po ochłodzeniu wytworzonej w wyniku homogenizacji emulsji. Surfaktanty, ze względu na ich chemiczną strukturę, można sklasyfikować jako: jonowe (kationowe i anionowe), niejonowe i amfoteryczne. Dobierając odpowiedni surfaktant podczas opracowywania składu formułacji nanocząstek lipidowych należy wziąć pod uwagę szereg czynników takich jak: wpływ na wielkość i polidispersyjność, sposób podania postaci leku, rolę jaką będzie odgrywał surfaktant podczas degradacji lipidu w układach *in vivo*. Co więcej, należy również zwrócić uwagę na toksyczność, kompatybilność z innymi składnikami formułacji, możliwie jak najmniejszą jego ilość użytą do przygotowania formułacji, niski koszt wytworzenia formułacji i jej, wszechstronne zastosowanie (R. Shah i inni, Springer Briefs in Pharmaceutical Science & Drug Development, 2015, 1-93). Zwykle zawartość surfaktantu w formułacjach SLN zawiera się w zakresie od 0,5% do 5% (w/v) (J. Pardeike, i inni, International Journal of Pharmaceutics, 2009, 366 (1-2), 170-184). Surfaktanty niejonowe mają tą przewagę nad jonowymi, że charakteryzują się znacznie niższą toksycznością i efektem drażniącym, co jest istotne gdy lek ma być podawany doustnie lub pozajelitowo (D. McClements i J. Rao, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2011, 51 (4), 285-330).

Ze względu na małą biogodność stosowanych syntetycznych surfaktantów i możliwość wywołania przez nie niepożądanych efektów ubocznych, coraz większą uwagę kieruje się w stronę wykorzystania w tej roli związków naturalnych, a zatem nietoksycznych, mających właściwości emulgujące i dyspergujące, takich jak na przykład fosfolipidy (PL).

Fosfolipidy to związki naturalne będące podstawowym składnikiem budulcowym błon komórkowych organizmów żywych, a zatem wykazujące

z nimi biozgodność. W swojej strukturze fosfolipidy posiadają fragment hydrofilowy składający się z reszty fosforanowej połączonej estrowo z alkoholoaminą (choliną lub etanoloaminą) lub inozytolem, wykazujący duże powinowactwo do wody i innych polarnych rozpuszczalników oraz część niepolarną (hydrofobową) składającą się z dwóch łańcuchów reszt kwasów tłuszczowych związanych estrowo ze szkieletem węglowym glicerolu w pozycji *sn-1* i *sn-2*. W literaturze naukowej i patentowej dostępnych jest wiele doniesień na temat wytwarzania lipidowych nanocząstek z wykorzystaniem naturalnych fosfolipidów w charakterze surfaktantu, takich jak chemicznie czysta fosfatydylocholina (PC), lecytyna pochodząca z żółtka jaja kurzego lub lecytyna sojowa.

W publikacji międzynarodowej zgłoszenia WO2013105101(A1) opisano sposób wytwarzania nanocząstek lipidowych do enkapsulacji hydrofilowych i amfifilowych leków takich jak izoniazyd, ryfampicyna, pirazynamid i innych. Jako składnik matrycy lipidowej stałych nanocząstek lipidowych (SLN) w podanych przykładach przygotowania wykorzystano behenian glicerolu lub kwas stearynowy lub mieszaninę tych dwóch lipidów, a jako stabilizator użyto niejonowych surfaktantów – polisorbatu 80 oraz lecytyny sojowej (PHOSPHOLIPON® 90H), gdzie lecytyna stanowiła 99% całkowitej ilości surfaktantów. Zastosowana metoda tworzenia mikroemulsji opierała się na przygotowaniu w pierwszej fazie mieszaniny surfaktantów w wodzie oraz stopienia lipidów. Obie fazy podgrzewano do temperatury 90°C, a następnie do lipidu dodawano roztwór surfaktantów i leku przy ciągłym mieszaniu. Tak przygotowaną mikroemulsję wlewano do zimnej wody (2°C) przy ciągłym mieszaniu (5 000 rpm), które kontynuowano przez 30 minut lub przez roztwór mikroemulsji przepuszczano azot przez czas 2 h w celu uzyskania nanocząstek SLN. Otrzymane w ten sposób nanocząstki lipidowe charakteryzowały się wielkością w przedziale 110-130 nm oraz niskim indeksem polidispersyjności (<0,3).

W amerykańskim opisie US20130243848(A1) ujawniono sposób wytwarzania nanocząstek lipidowych o przedłużonym uwalnianiu mogących znaleźć zastosowanie w terapii genowej. Skład tych nanocząstek zawierał koniugat siRNA z lipidem kationowym znajdujący się w matrycy złożonej z lipidu stałego (tristearynian glicerolu) otoczonego monowarstwą lipidową złożoną z lecytyny sojowej oraz 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino-*N*-(metoksy(polietylenoglikolu)) (DSPE-PEG) w proporcji lecytyna:DSPE-PEG 0,2-0,5:0,1-0,2. Zgodnie z opisaną metodą otrzymano nanocząstki o wymiarach 150-800 nm.

Z amerykańskiego opisu zgłoszenia US20170035701(A1) znany jest również sposób wytwarzania formułacji farmaceutycznych będącymi dyspersją lipidów stabilizowanych przez naturalne fosfolipidy lub glikol polialkilenowy zakończony fragmentem lipidowym. Wskazano ich zastosowanie jako nanonośniki leków (docetaksel, amfoterycyna B, irynotekan), składników aktywnych nutraceutycznie (kurkumina, resweratrol, honokiol, magnoliol, kwercetyna) lub tych słabo rozpuszczalnych w wodzie. Jako surfaktant stosowano lecytynę sojową, lecytynę z żółtka jaja kurzego lub syntetyczne fosfolipidy osobno lub wraz z koniugatami lipidu z polietylenoglikolem lub PEGyłowanymi fosfolipidami. Otrzymane nośniki charakteryzowały się wielkością cząstek w zakresie 90-155 nm, indeksem polidispersyjności w przedziale 0,05-0,8 i stopniem enkapsulacji powyżej 50%.

Powyższe przykłady zastosowania fosfolipidów w formułacjach farmaceutycznych odnoszą się do związków, których główną funkcją jest emulgowanie i stabilizowanie dyspersji nanocząsteczek lipidowych. Do tej pory w literaturze naukowej i patentowej opisano nieliczne zastosowania fosfolipidów będących koniugatami z biologicznie aktywnymi związkami pochodzenia naturalnego (PL-BAC, z ang. *biologically active compound*), takimi jak izomery sprzężonego kwasu linolowego (CLA), gdzie fosfolipid występuje w charakterze surfaktantu, będącego składnikiem powierzchni międzyfazowej lipidowych nanonośników. Przykładem może być

zastosowanie fosfatydylocholiny związanej kowalencyjnie w pozycji *sn*-1 i *sn*-2 z mieszaniną izomerów *cis*-9,*trans*-11 (46%) i *trans*-10,*cis*-12 CLA (45%). W opisaney w publikacji (A. Pucek, N. Niezgoda i inni, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2017, 532, 377-388) metodzie homogenizacji wysokociśnieniowej otrzymano nanocząstki SLN i NLC z zastosowaniem mieszaniny polioksyetylenowej pochodnej sorbitanu (Tween® 80) oraz fosfatydylocholiny modyfikowanej sprzężonym kwasem linolowym w stosunku, odpowiednio 1:1 do 1:5 jako surfaktantów. Opracowana metoda pozwoliła uzyskać nanonośniki lipidowe charakteryzujące się wielkością w zakresie 160-230 nm o indeksie polidispersyjności poniżej 0,29 oraz wartości potencjału zeta (ζ) pomiędzy -2,7 a -10,4 mV.

Sprzężony kwas linolowy (CLA) należy do grupy nienasyconych kwasów tłuszczowych o osiemnastowęglowym łańcuchu. W swojej strukturze posiada układ dwóch sprzężonych ze sobą wiązań podwójnych, które teoretycznie mogą występować w pozycji od C-2 do C-14 oraz jako izomery geometryczne *cis/trans*. Najbardziej rozpowszechniony w naturze jest izomer *cis*-9,*trans*-11 CLA, który występuje głównie w mięsie i mleku pochodzących od zwierząt przeżuwających i stanowi 76-84% wszystkich izomerów CLA (Y. W. Park i inni, *Small Ruminant Research*, 2007, 68, 88). W licznych badaniach na zwierzętach oraz badaniach *in vitro* przeprowadzonych na różnych liniach komórek ludzkich zostało udowodnione, że sprzężony kwas linolowy posiada szerokie spektrum aktywności, między innymi wpływa na funkcje immunologiczne, działa przeciwnowotworowo, przeciwmiażdżycowo oraz sprzyja redukcji tkanki tłuszczowej (B. Yang i inni, *Journal of functional foods*, 2015, 15, 314-325). Ponadto zaobserwowano, że poszczególne izomery CLA mogą posiadać różną aktywność, działać synergistycznie lub nawet znosić nawzajem swoje działanie (J. H. Kim i inni, *Annual review of food science and technology* 2016, 7, 221-244).

W obliczu tych doniesień korzystnym wydaje się stosowanie aktywnych biologicznie izomerów CLA w formie czystej izomerycznie (>90%) zarówno jako preparatów w postaci wolnych kwasów tłuszczowych lub też koniugatów fosfolipidowych gdzie aktywny izomer CLA związany jest z *sn*-glicero-3-fosfocholimą wiązaniem estrowym. W publikacji (N. Niezgoda i inni, Australian Journal of Chemistry, 2015, 68(7), 1065-1075) opisano metodę syntezy 1,2-di-(9Z,11E-octadekadienoilo)-*sn*-glicero-3--fosfocholiny (PC-*c9,t11*-CLA). Badania *in vitro* na liniach komórek nowotworowych białaczki promielocytarnej (HL-60) oraz raka piersi (MCF-7) wykazały duży potencjał PC-*c9,t11*-CLA w hamowaniu proliferacji komórek, a dawka inhibicyjna IC₅₀ wyniosła odpowiednio 29,4±11,7 i 45,8±6,6 μM przy czasie inkubacji wynoszącym 24h.

Nieoczekiwanie okazało się, że wprowadzenie związku wykazującego aktywność biologiczną, takiego jak izomer *cis*-9,*trans*-11 CLA do struktury fosfatydylocholiny jako cząsteczki o amfifilowym charakterze, posiadającej zdolności do łatwego przenikania przez błony biologiczne, jest korzystne ze względu na możliwość zwiększenia przyswajalności związku aktywnego oraz wykorzystania takiej fosfatydylocholiny w charakterze proleku. Z uwagi na właściwości powierzchniowo czynne koniugaty fosfatydylocholiny z biologicznie aktywnymi związkami posiadają również duży potencjał jako surfaktant stabilizujący dyspersję nanonośników.

Zlokalizowanie różnych związków aktywnych w dwóch obszarach nanocząstki ogranicza ich wzajemną chemiczną i fizyczną interakcję oraz powoduje, że zwiększa się sumaryczna ilość substancji aktywnych możliwych do wprowadzenia w strukturę nośnika. Powyższa koncepcja budowy lipidowych nanocząsteczek ma na celu skorelowanie aktywności terapeutycznych poszczególnych jego komponentów w jednej nanocząstce, by zapewnić wzmocnienie efektu terapeutycznego, stwarzając możliwość ich zastosowania w medycynie personalizowanej,

gdzie terapia antynowotworowa może być dobrana indywidualnie do potrzeb pacjenta.

Istotą rozwiązania według wynalazku są stałe nanocząstki lipidowe stabilizowane amfoterycznym surfaktantem z grupy fosfolipidów, a mianowicie 1,2-di-(9Z,11E-oktadekadienoilo)-*sn*-glicero-3-fosfocholimą, o wzorze 1 oraz niejonowym surfaktantem polioksyetylenowany monooleinian sorbitanu.

Korzystnie jest, gdy niejonowym surfaktantem polioksyetylenowanym monooleinianem sorbitanu jest polisorbitat 80.

Korzystnie również jest, gdy 1,2-di-(9Z,11E-oktadekadienoilo)-*sn*-glicero-3-fosfocholimą o wzorze 1, zawiera powyżej 90% reszt izomeru *cis*-9,*trans*-11 sprzężonego kwasu linolowego związanych estrowo z *sn*-glicero-3-fosfocholimą w pozycji *sn*-1 i *sn*-2.

Z kolei, istotą sposobu według wynalazku jest to, że w pierwszej kolejności przygotowuje się fazę wodną ze związkami powierzchniowo czynnymi stanowiącą mieszaninę 1,2-di-(9Z,11E-oktadekadienoilo)-*sn*-glicero-3-fosfocholiny, w ilości wagowej od 0,15 do 0,45% oraz niejonowego surfaktantu polioksyetylenowanego monooleinianu sorbitanu, korzystnie polisorbitatu 80, w ilości od 0,25 do 0,75%. Całość podgrzewa się przy delikatnym mieszaniu do całkowitego zdyspergowania fosfatydylocholiny ale w temperaturze nie wyższej niż 70°C. Kolejno przygotowuje się fazę lipidową będącą stopionym lipidem, stałym w temperaturze pokojowej i temperaturze ciała człowieka, której stężenie wynosi od 2 do 4% wag. wszystkich składników formulacji. Następnie wlewa się fazę wodną do fazy lipidowej i poddaje się mieszaniu przy obrotach 16000-24000 rpm w temperaturze zapewniającej stan ciekłej fazy lipidowej, do momentu zdyspergowania lipidu. Mikroemulsję poddaje się działaniu ultradźwięków, otrzymując po ochłodzeniu opalizującą lub mleczną, termodynamicznie stabilną zawiesinę stałych nanocząstek lipidowych.

Korzystnie jest, gdy jako lipid stały, stosuje się mieszaninę tri-, mono- i diglicerydów kwasów tłuszczowych o długości łańcucha węglowego C8-C18 albo воск pszczeli, albo palmitynian cetylu.

Korzystnie również jest, gdy 1,2-di-(9*Z*,11*E*-oktadekadienoilo)-*sn*-glicero-3-fosfocholiny stosuje się w ilości 0,3-0,45% wag., a polisorbat 80 w ilości 0,5-0,75% wag.

Korzystnie także jest, gdy faza lipidowa stanowi 2-3% wag. wszystkich składników formulacji.

Korzystnie również jest, gdy mieszanie wykonuje się w czasie od 2 do 10 min.

Korzystnie także jest, gdy działanie ultradźwiękami przeprowadza się przez czas 2-5 minut z zastosowaniem amplitudy równej 70-90% mocy.

Zaletą wytwarzanych stałych nanonośników lipidowych według wynalazku są: bardzo duża homogeniczność produktu, jednorodność otrzymanych nanocząstek, nanoskopowa wielkość (<200 nm), właściwa dla efektywnego wnikania nanocząstek przez błony biologiczne komórek, duża stabilność fizyczna, mała lepkość. Zastosowanie formulacji nanocząsteczek według wynalazku jest potencjalnie korzystne dla aplikacji kosmetycznych i farmaceutycznych zwłaszcza dla terapii przeciwnowotworowej.

Zaletą wykorzystania 1,2-di-(9*Z*,11*E*-oktadekadienoilo)-*sn*-glicero-3-fosfocholiny jest uzyskanie przedziałowości w strukturze nanonośnika lipidowego, gdzie jeden związek aktywny, np. *cis*-9,*trans*-11 CLA, związany jest kowalencyjnie z PL, a zatem zlokalizowany jest w powierzchni międzyfazowej i stanowi prolek, podczas gdy inny składnik aktywny farmaceutycznie, np. lek przeciwnowotworowy może zostać załadowany w lipidowym rdzeniu nanocząstek.

Przedmiot wynalazku został przedstawiony bliżej w przykładzie wykonania, wzorem 1, a także na rysunku, o fig. 1-6, gdzie na fig.1 przedstawione zostały wyniki badań wielkości średnicy hydrodynamicznej

(D_H) uzyskanych w wyniku pomiaru metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) dla formułacji stałych nanocząstek lipidowych opisanych w przykładzie wykonania. Na fig. 2 przedstawiono wyniki pomiaru potencjału zeta (ζ) uzyskanych metodą DLS. Na fig. 3 przedstawiono zdjęcie nanocząstek SLN wykonane transmisyjnym mikroskopem elektronowym (TEM). Fig. 4 przedstawia wyniki testów stabilności przechowalniczej otrzymanych dyspersji stałych nanocząstek lipidowych po czasie 2 i 7 dni przechowywania w temperaturze 4, 20 lub 40°C wyrażonych jako współczynnik niestabilności obliczony na podstawie wyników uzyskanych podczas wirowania w technice sedymentacji wirówkowej za pomocą analizatora dyspersji LUMiSizer®. Współczynnik niestabilności (z ang. *instability index*, I_{NI}) oblicza się na podstawie zmian w transmitancji światła o danej długości fali (tutaj 865 nm) na całej długości wirowanej próbki spowodowanych separacją faz poprzez śmietankowanie powstałe na skutek działania siły odśrodkowej w warunkach wirowania (tutaj 4000 rpm, 25°C) w określonym czasie trwania analizy, podzielonym przez maksymalną uzyskaną transmitancję podczas wirowania. Indeks niestabilności jest liczbą bezwymiarową i waha się od 0 (bardziej stabilny) do 1 (bardziej niestabilny). Fig. 5 ukazuje profil rozdziału kinetycznego nanocząstek SLN przechowywanych przez czas 2 dni w temperaturze 4°C uzyskany za pomocą analizatora dyspersji LUMiSizer®. Fig. 6 przedstawia wyniki badań cytotoksyczności uzyskanych w standardowym teście MTT podczas inkubacji (24h) prawidłowych komórek nabłonkowych jajnika (linia CHO-K1) z odpowiednio rozcieńczonymi dyspersjami nanocząstek lipidowych. Stężenie nanocząstek SLN na rysunku fig. 6 podano w przeliczeniu na ilość związku aktywnego 1,2-di-(9Z,11E-oktadekadienoilo)-sn-glicero-3-fosfocholiny stanowiącego składnik fazy surfaktantu wyrażoną w mikromolach na dm³.

Przykład:

Roztwór surfaktantu stanowiący fazę wodną, o składzie:

- 4952,5 mg wody dejonizowanej
- 22,5 mg (0,45% wagowych) 1,2-di-(9Z,11E-oktadekadienoilo)-sn-glicero-3-fosfocholiny otrzymanej zgodnie z opisaną metodą (N. Niezgoda i inni, Australian Journal of Chemistry, 2015, 68(7), 1065-1075) o składzie izomerycznym reszt sprzężonego kwasu linolowego (wg GC): *cis*-9,*trans*-11 – 94,5%; *trans*-10,*cis*-12 – 2,5%; inne izomery – 3,0%
- 25 mg (0,5% wagowych) polisorbatu 80 (Tween® 80),

miesza się przy pomocy mieszadła magnetycznego w temperaturze 55°C przez 1 h, do całkowitego zdyspergowania fosfatydylocholiny, a następnie stabilizuje w temperaturze 53°C przez 20 minut.

Fazę lipidową będącą mieszaną glicerydów kwasów tłuszczowych o długości łańcucha węglowego C8-C18 (Gelucire® 43/01), stanowiącą 2% wagowych wszystkich składników formułacji (100 mg) podgrzewa się w temperaturze 53°C do rozpuszczenia i stabilizuje w temperaturze 53°C przez czas 20 minut. Do tak przygotowanego lipidu wlewa się roztwór surfaktantów i miesza w stałej temperaturze 53°C przy pomocy wysokoobrotowego homogenizatora stosując obroty 24000 rpm przez 2 minuty, następnie otrzymaną mikroemulsję niezwłocznie poddaje się działaniu ultradźwięków za pomocą sonikatora o mocy 130W i częstotliwości 20 kHz przez 3 minuty stosując moc równą 90% amplitudy. Po tym czasie pozostawia się otrzymaną nanoemulsję do ochłodzenia w temperaturze pokojowej otrzymując mleczną dyspersję stałych nanocząstek lipidowych, których średnica hydrodynamiczna (D_H) wynosi $110,9 \pm 1,0$ nm; indeks polidispersyjności (Pdl) równy jest $0,151 \pm 0,004$; a potencjał zeta (ζ) to $-13,3 \pm 0,36$ mV.

UNIwersytet PRzyrodniczy
WE WROcławiu
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław

RZECZNIK PATENTOWY
dr inż. Anna Kasperowicz
Nr upr. 3340