



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102018001541-9 A2



(22) Data do Depósito: 24/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 04/12/2018

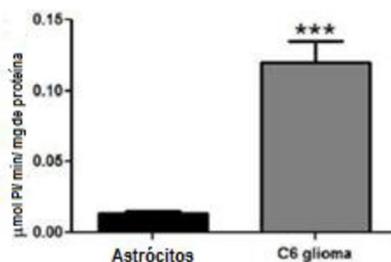
(54) **Título:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA DE LIBERAÇÃO DE MOLÉCULAS DE RNA DE INTERFERÊNCIA E USO DA MESMA

(51) **Int. Cl.:** A61K 48/00; C12N 15/113; A61K 9/127; A61P 35/00.

(71) **Depositante(es):** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA.

(72) **Inventor(es):** ELIZANDRA BRAGANHOL; ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI; HELDER TEIXEIRA; MARCO ANTÔNIO STÉFANI; FERNANDA BRUXEL; ROSELIA MARIA SPANEVELLO; FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA; JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA.

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA DE LIBERAÇÃO DE MOLÉCULAS DE RNA DE INTERFERÊNCIA E USO DA MESMA. A presente invenção refere-se a uma composição em escala nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsões contendo filamentos de RNA de interferência (siRNA) capazes de silenciar o gene responsável pela expressão de proteínas de adesão superexpostas em tumores, como a enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73 (CD73) superexpressa no glioblastoma multiforme e em outros tipos de tumores. A união dos lipossomas ou nanoemulsões com o siRNA promove um complexo de liberação sítio-direcionado capaz de ser incorporado a diversos tipos de formulação, como injeção intratumoral, intravenosa ou administração nasal.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA DE LIBERAÇÃO DE MOLÉCULAS DE RNA DE INTERFERÊNCIA E USO DA MESMA

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção situa-se nos campos da Nanotecnologia, Farmácia e Genética, sendo relacionada a uma composição em escala nanométrica de liberação de moléculas de RNA de interferência capazes de silenciar genes responsáveis pela expressão de proteínas e enzimas superexpostas em tumores. A composição da invenção contém lipossomas ou nanoemulsões que interagem de forma eficaz com o RNA de interferência, formando complexos de liberação sitio-direcionada. A composição proporciona compatibilidade com uma pluralidade de formulações farmacêuticas, além de ser mais segura que os métodos tradicionais.

Histórico da Invenção

[0002] O câncer ou cancro é um grupo de doenças que envolvem o crescimento celular anormal, com potencial para invadir e espalhar-se para outras partes do corpo, além do local original. Uma massa celular com esse crescimento anormal é denominada de tumor.

[0003] Glioma é um termo geral para um grupo de tumores cerebrais que apresentam características fenotípicas e expressão gênica similares a células gliais. Vários tipos de tumores podem ser considerados gliomas, como o glioblastoma multiforme. A maioria dos tumores cerebrais de crescimento rápido são gliomas de grau IV.

[0004] O glioblastoma multiforme, também conhecido como glioblastoma, é o tipo mais comum e agressivo de tumor maligno cerebral que acomete os seres humanos. Os sinais e sintomas iniciais são inespecíficos e podem incluir cefaleia, alterações de personalidade, náuseas e sintomas similares aos de um acidente vascular cerebral. O agravamento dos sintomas é geralmente rápido,

podendo evoluir para um quadro de inconsciência. O prognóstico para portadores desse tipo de tumor é reservado e o tempo de sobrevida médio após o diagnóstico é de 12 a 15 meses.

[0005] Os métodos de tratamento atuais consistem basicamente na neurocirurgia, na utilização de substâncias que inibem o crescimento tumoral, seja na inibição da angiogênese necessária para a demanda de recursos desse tipo de tumor, ou seja, na ação citotóxica que impede a replicação – e, por conseguinte crescimento – do tumor.

[0006] A neurocirurgia para retirada das células tumorais, apesar de ser um método eficaz de tratamento, possui alguns complicadores clássicos, como a localização do tumor e o grau de invasividade. Dependendo da região de crescimento, alguns tumores podem ser inoperáveis, ou ainda operáveis, mas com elevado perigo cirúrgico e/ou grande desconforto pós-cirúrgico para o paciente.

[0007] O uso de substâncias que inibem o crescimento tumoral também apresenta desvantagens. A substância de primeira linha para o tratamento de glioblastoma multiforme é a temozolomida, um quimioterápico oral e agente alquilante antineoplásico. Apesar de ser uma droga nova e com poucos efeitos colaterais, ainda apresenta riscos, uma vez que é genotóxica e teratogênica. Sua eficácia também é limitada devido à velocidade de replicação do tumor, e sua principal utilização é para aumentar a sobrevida do paciente.

[0008] Em relação às formulações contendo as referidas substâncias inibidoras de crescimento, a maioria se apresenta na forma oral ou intravenosa. Dependendo da substância que está sendo administrada, algumas desvantagens também podem ser percebidas. No caso da temozolomida, por exemplo, uma administração oral deve ter dosagem capaz de minimizar o metabolismo primário hepático, além de se espalhar na corrente sanguínea, inibindo a divisão celular de outras células saudáveis e gerando o desconforto de medicamentos quimioterápicos, desvantagem essa também presente na administração intravenosa. Outros medicamentos podem apresentar ainda o

problema de atravessar a barreira hematoencefálica, uma vez que o glioblastoma se encontra no cérebro.

[0009] Para ser ideal, uma formulação antineoplásica deveria ser capaz de entregar apenas a quantidade eficaz do ativo quimioterápico no sítio específico de ação, além de ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e ser de fácil administração.

[0010] Além disso, a toxicidade do ativo quimioterápico escolhido deve ser rigorosamente analisada. Idealmente, o ativo quimioterápico deveria ser eficaz apenas as células tumorais, inibindo seletivamente a replicação celular.

[0011] Contudo, formulações antineoplásicas atuais possuem ação sistêmica e carregam altas dosagens de ativos quimioterápicos tóxicos, trazendo efeitos colaterais significativos para os pacientes.

[0012] A presente invenção pretende abordar todos os problemas acima explicitados. A invenção compreende um sistema de lipossomos ou de nanoemulsão, contendo uma quantidade específica e eficaz de ativo quimioterápico de ação genética. A invenção se utiliza de fitas de RNA de interferência capazes de silenciar o gene responsável pela transcrição da proteína de adesão e enzima geradora de adenosina, uma molécula promotora tumoral, ecto-5'-nucleotidase/CD73, superexpressa em diversos tumores, incluindo o glioblastoma.

[0013] Dessa forma, a presente invenção aborda não só uma formulação capaz de carrear apenas a quantidade eficaz de ativo como um ativo específico para características tumorais.

Antecedentes da invenção:

[0014] O documento WO 2004/079013 descreve um método de diagnóstico e predição do estágio de câncer pancreático que compreende a detecção da expressão e atividade da proteína ecto-5'-nucleotidase em uma amostra de células cancerígenas e a comparação dos resultados com células normais. O documento ainda relata composições para o tratamento de tumores contendo fragmentos de RNA de interferência, e que essas composições podem ser

lipossomas e emulsões. Contudo, não há menção ao tratamento de glioblastomas ou ao tamanho nanométrico das formulações.

[0015] O documento PI 0709506-6 descreve o uso de RNA de interferência para a inibição da expressão do mRNA de tirosina quinase do baço (SYK), particularmente para o tratamento de pacientes que têm uma condição inflamatória relacionada com a SYK ou correndo o risco de desenvolver uma condição inflamatória relacionada com a mesma, tal como conjuntivite alérgica, inflamação ocular, dermatite, rinite, asma, alergia, ou doença de células mastóideas.

[0016] O documento PI 0619738-8 descreve sequências de RNA de interferência (siRNA) isoladas, compreendendo um filamento de RNA sentido e um filamento de RNA anti-sentido complementar, que formam juntos um dúplex de RNA, com fragmentos de 14 a 30 nucleotídeos contíguos da sequência nucleotídica do exon F do gene codificador da proteína miosina V. O documento também descreve composições que compreendem pelo menos um siRNA e a utilização de pelo menos esse siRNA como agente cosmético ou terapêutico para a despigmentação da pele.

[0017] O artigo científico “Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis”, publicado na revista Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) em 26 de Janeiro de 2010, descreve, como supõe o título, o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal seletivo para a proteína de adesão ecto-5'-nucleotidase, que é superexpressa em tumores de mama.

[0018] Dessa forma, nenhuma das anterioridades descreve, ao mesmo tempo, um sistema de lipossomas/nanoemulsões, contendo fragmentos de RNA de interferência específicos, e utilizados para inibir a atividade da proteína de adesão e enzima geradora de adenosina extracelular, a ecto-5'-nucleotidase em glioblastomas.

[0019] Em virtude de todas as informações/limitações acima mostradas, os inventores buscaram e desenvolveram a presente invenção, que proporciona

soluções a diversos problemas técnicos já apresentados. O presente documento descreve formulações nanométricas antineoplásicas, que visam contornar diversos dos problemas citados acima e promover segurança e eficácia no tratamento de glioblastomas.

Sumário da Invenção

[0020] A presente invenção refere-se a uma formulação em escala nanométrica contendo filamentos de RNA de interferência capazes de silenciar genes que regulam a expressão de proteínas de adesão superexpostas em alguns tipos de tumores.

[0021] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê uma composição nanométrica constituída de lipossomas ou nanoemulsões contendo filamentos de RNA de interferência.

[0022] Em um segundo aspecto, a presente invenção é provê o uso da dita composição para silenciar genes que regulam a expressão de proteínas superexpostas em tumores.

[0023] Em um terceiro aspecto, a presente invenção apresenta um complexo de lipossomas ou nanoemulsão com o RNA de interferência capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e ser sitio-específico.

[0024] Em um quarto aspecto, a presente invenção provê uma formulação farmacologicamente aceitável contendo a composição nanométrica.

[0025] Em uma concretização, a formulação farmacologicamente aceitável é uma injeção intratumoral, uma injeção intravenosa ou um spray nasal.

[0026] Estes e outros aspectos, características e vantagens da invenção se tornarão ainda mais evidentes para os técnicos no assunto a partir da descrição detalhada a seguir e das reivindicações anexas.

Breve Descrição das Figuras

[0027] A figura 1 mostra a análise da atividade/expressão de ecto-5'-NT/CD73 em células de glioma C6 e efeito de AMPCP sobre a proliferação celular.

[0028] A figura 2 mostra a avaliação do silenciamento de ecto-5'-NT/CD73 por sequências específicas de siRNA-CD73.

[0029] A figura 3 mostra a caracterização morfológica dos complexos de nanoemulsão (NE)/siRNA-CD73.

[0030] A figura 4 mostra a otimização da transfecção de glioma C6 utilizando complexos NE/siRNA.

[0031] A figura 5 mostra a análise de citotoxicidade do complexo NE/siRNA-GFP em culturas de astrócitos.

[0032] A figura 6 mostra a avaliação do silenciamento da enzima ecto-5'-NT/CD73 por complexos NE/siRNA-CD73.

[0033] A figura 7 mostra a análise do tratamento com NE/siRNA-CD73 na viabilidade celular de glioma C6.

Descrição Detalhada da Invenção

[0034] A presente descrição visa aprofundar o detalhamento sobre o conceito inventivo, prover exemplos que facilitem a cognição/compreensão do mesmo e fornecer dados técnicos precisos sobre algumas das formas de concretizar o conceito inventivo da invenção. A descrição detalhada também visa evitar a repetição, por terceiros, da extensa experimentação, investimentos financeiros, de tempo e de atividade intelectual que os inventores/depositante fizeram para resolver os problemas técnicos ora resolvidos.

[0035] Para evitar dúvidas quanto à interpretação, qualquer característica descrita em um aspecto da presente invenção pode ser utilizada em outro aspecto da invenção. A palavra “compreendendo” pretende significar “incluindo”, mas não necessariamente “consistindo de” ou “composto apenas por”. Em outras palavras, as etapas ou opções listadas não precisam ser exaustivas. Nota-se que os exemplos fornecidos na descrição abaixo visam esclarecer a invenção, e não devem *per se* ser interpretados como limitantes do escopo da invenção.

[0036] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê uma composição

farmacêutica nanométrica compreendendo lipossomas ou nanoemulsão contendo filamentos de RNA de interferência.

[0037] Em uma concretização da composição farmacêutica nanométrica, os filamentos de RNA de interferência são compostos por duas sequências idênticas de 19 nucleotídeos em orientação invertida, separadas por um espaço de 9 pares de bases, definidas de acordo com as SEQ ID No: 1, SEQ ID No:2 e SEQ ID No: 3.

[0038] Em uma concretização da composição farmacêutica nanométrica, a mesma compreende adicionalmente um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0039] Em uma concretização da composição farmacêutica nanométrica, a mesma está na forma de uma injeção intratumoral, parenteral ou spray nasal.

[0040] Em um segundo aspecto, a presente invenção provê o uso da dita composição farmacêutica nanométrica para preparar um medicamento para silenciar genes responsáveis pela expressão de proteínas superexpostas em tumores.

[0041] Em uma concretização do uso, o gene silenciado é o 5'-nucleotidase-ecto.

[0042] Em uma concretização do uso, a proteína a ser regulada é a ecto-5'-nucleotidase/CD73.

[0043] Em uma concretização do uso, o tumor é o glioblastoma multiforme .

[0044] Em uma concretização do uso, a dita composição é administrada na forma de uma injeção intratumoral, parenteral ou spray nasal.

[0045] O tratamento do glioblastoma multiforme permanece um desafio para a oncologia. As terapias oferecidas atualmente são apenas de caráter paliativo e a sobrevida média dos pacientes diagnosticados é de apenas 12 meses.

[0046] Dessa forma, a invenção proposta tem como objetivo oferecer uma nova estratégia terapêutica para o tratamento do glioblastoma multiforme que também poderá ser utilizada para outras neoplasias ainda sem cura ou refratárias aos tratamentos disponíveis.

[0047] O alvo da terapia é a enzima e proteína de adesão ecto-5'-nucleotidase/CD73 (CD73). O aumento da expressão e da atividade enzimática dessa proteína tem sido amplamente reportado em tecidos tumorais, inclusive em glioblastomas, e está associado a aumento das características de malignidade tumoral, como migração, adesão, invasão, angiogênese e escape do sistema imune. Assim, estratégias para diminuir a expressão e/ou a atividade da CD73 poderiam ser úteis para o tratamento do glioblastoma multiforme e também de outras neoplasias que apresentem o aumento de expressão desse alvo.

[0048] Uma forma inovadora de silenciamento da expressão gênica é a utilização de sequências de RNA de interferência (siRNA) para um determinado alvo. O RNA de interferência é um mecanismo exercido a partir de uma fita dupla de RNA de aproximadamente 19-23 nucleotídeos que desencadeia a clivagem de sequências específicas de RNA mensageiro, resultando na inibição da expressão gênica na fase de tradução ou dificultando a transcrição de genes específicos. O resultado final é a diminuição da expressão da proteína alvo que, nessa proposta, é a CD73.

[0049] Apesar da tecnologia do siRNA ser muito promissora, a sua utilização na clínica esbarra em alguns fatores como a dificuldade em acessar o sistema nervoso central devido as limitações impostas pela barreira hematoencefálica (BHE) e a degradação das sequências siRNA por nucleases endógenas.

[0050] Como forma de contornar tais problemas, as sequências de siRNA podem ser administradas localmente, via injeções intracerebrais/intratumorais, via intranasal ou sistemicamente, via intravenosa, utilizando sistemas lipossomais ou nanoemulsões como carreadores de dispensação. Tais formulações interagem eficientemente com siRNA, formando complexos que potencialmente cruzam as barreiras celulares e hematoencefálica e facilitam a liberação sítio direcionada, a captação celular e a interação com o alvo intracelular das sequências siRNA.

[0051] Além disso, a utilização de vetores não-virais como os

lipossomas/nanoemulsões tem sido considerada uma alternativa mais atrativa quando comparada aos vetores-virais, devido a aspectos de biossegurança.

[0052] Resumidamente, a presente invenção apresenta uma composição em escala nanométrica, contendo lipossomas ou uma nanoemulsão contendo filamentos de RNA de interferência específicos (siRNA), capazes de silenciar o gene 5'-nucleotidase-ecto, também conhecido como NT5E ou gene ID: 4907. Esse gene é responsável pela expressão da proteína de adesão ecto-5'-nucleotidase/CD73 (CD73) superexpressa no glioblastoma multiforme e em outros tipos de tumores.

Cultura de Células e Linhagem Celular:

[0053] A linhagem celular de glioma (C6) foi obtida da ATCC (American Type Cell Collection, USA) e foi cultivada em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), um meio de cultura estéril que contém glicose, L-glutamina e bicarbonato de sódio, e 5% de soro fetal bovino (SFB) em incubadora de células a 37°C e 5% CO₂ / 95% umidade, de acordo com protocolo padrão de manutenção de cultivos celulares.

[0054] Culturas primárias de astrócitos foram preparadas do zero. O córtex de ratos Wistar recém-nascidos (1-2 dias de idade) foram removidos e dissociados mecanicamente numa solução salina equilibrada livre de Ca²⁺ e Mg²⁺ (pH 7,4), contendo 137 mM de NaCl, 5,36 mM de KCl, 0,27 mM de Na₂HPO₄, 1,1 mM de KH₂PO₄, e 6,1 mM de glicose. Após centrifugação a 1000 g durante 5 min, o sedimento foi ressuspensão em meio de cultura (pH 7,6) contendo 1% de DMEM, 8,39 mM do tampão HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico) pH 7,6, 23,8 mM de NaHCO₃, 0,1% de fungizona® (Anfotericina B, antifúngico), 0,032% do antibiótico garamicina e 10% de SFB. As células foram semeadas a uma densidade de 1,5 x 10⁵ células/cm² em placas de 24 poços pré-tratadas com poli-L-lisina. As culturas também foram mantidas em 5% de CO₂ / 95% de ar a 37°C.

[0055] Posteriormente, as células foram tratadas com adenosina 5'-(α,β -metileno)-difosfato (AMPCP, Sigma, USA), um inibidor seletivo da CD73 e

utilizado para estudar a regulação de sinalização adenosinérgica através dessa proteína. O AMPCP foi dissolvido em água a uma concentração de 100 mM (solução estoque) e posteriormente diluído em DMEM 5% / SFB para obter as concentrações de uso (1, 10 e 100 μ M). As células de glioma C6 (2×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços. Após 24 h, as culturas foram tratadas com AMPCP por 48 h. Controles foram expostos apenas ao meio DMEM 5% / SFB.

[0056] Após o tratamento com AMPCP, o meio foi removido, as células foram lavadas com solução tampão PBS (phosphate buffered saline, solução contendo NaCl e NaHPO_4), tripsinizadas com 200 μ L de 0.25% solução de tripsina e contadas em câmara de Neubauer.

[0057] Tratadas as células, foram feitos ensaios de atividade enzimática, viabilidade celular e imunocitoquímica para a CD73, de forma a determinar a confiabilidade dos testes com os complexos NE/siRNA.

[0058] A atividade enzimática das células C6 foi determinada em um meio de incubação (2 mM de MgCl_2 , 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM de glucose, 20 mM de HEPES [pH 7.4], e 2 mM de AMP [adenosina monofosfato]) a 37°C por 10 min, onde o fosfato inorgânico liberado pela ação da CD73 foi dosado e a concentração de proteínas foi avaliada pelos métodos do verde de malaquita e Coomassie Blue, respectivamente. A atividade específica foi expressa como $\mu\text{mol Pi liberado/min/mg proteína}$.

[0059] No ensaio de viabilidade celular 5×10^3 células de glioma C6 ou astrócitos primários por poço foram expostos aos complexos NE/siRNA e após 48 horas a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT, um ensaio colorimétrico onde um composto tetrazólico de cor amarela é reduzido a formazan de cor roxa em células vivas.

[0060] No ensaio de imunocitoquímica para a CD73, culturas de glioma C6 foram fixadas em solução de acetona/formalina e lavadas 3 vezes por 10 min cada com PBS. As células foram incubadas com a solução de bloqueio (7% SFB preparado em PBS contendo 0.2% Tween-20 [polisorbato, surfactante não

iônico]) por 45 min a temperatura ambiente. Após, as células foram incubadas por 90 min com o anticorpo primário policlonal *rabbit anti-rat* CD73 (rNu-9_{L15}, 1:1000) diluído em 7% SFB preparado em PBS contendo 0.2% Tween-20. As células foram então incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC (anticorpos purificados por afinidade com uma especificidade bem caracterizada, proporcionando uma maior sensibilidade através da amplificação do sinal, uma vez que múltiplos anticorpos secundários podem ligar-se a um único anticorpo primário; conjugado isotianato de fluoresceína; 1:1000) por 60 min a temperatura ambiente. As imagens foram capturadas usando uma câmera digital acoplada a um microscópio.

Desenvolvimento de sequências siRNA para proteína de adesão ecto-5'-NT/CD73:

[0061] As sequências do DNA que codificam a CD73 (gene ID:4907) foram selecionadas para realizar o design de sequências siCD73. Todas as sequências desenhadas foram avaliadas pelo BLAST (NCBI) a fim de confirmar a homologia específica com o gene alvo.

[0062] Oligonucleotídeos sintéticos sense e antisense constituíram o molde para a geração de uma molécula de RNA composta por duas sequências idênticas de 19 nucleotídeos em orientação invertida, separadas por um espaço de 9 pares de bases, formando um harpin de siRNA, de acordo com a Tabela 1 e as sequências definidas respectivamente como SEQ ID No:1, SEQ ID No:2 e SEQ ID No: 3. Como controles do siRNA foram utilizadas sequências *scramble* ausentes na base de dados do genoma de humanos, ratos ou camundongos.

siRNA	Sequências	
GFP	<i>Sense</i>	5'[Phos]rCrArGrGrCrUrArCrUrUrGrGrArGrUrGrUrArUdTdT3'
	<i>Antisense</i>	[Phos]rArUrArCrArCrUrCrCrArArGrUrArGrCrCrUrGdTdT3'
961	<i>Sense</i>	5'[Phos]rGrCrCrArUrCrArArArGrCrArGrArCrArUrUrArArC3'
	<i>Antisense</i>	5'[Phos]rUrArArUrGrUrCrUrGrCrUrUrUrGrArUrGrGrCrUrG3'
980	<i>Sense</i>	5'[Phos]rArCrCrArGrUrGrGrArGrGrArUrArArArUrUrArG3'
	<i>Antisense</i>	5'[Phos] rArArUrUrUrUrArUrCrCrUrCrCrArCrUrGrGrUrUrA3'

Tabela 1

Preparo e caracterização das nanoemulsões (NE):

[0063] NE compostas de 8% (w/w) de triglicerídeos de cadeia média, 2% (w/w) de lecitina de ovo, 0,132% (w/w) de DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilammonio metilsulfato, um agente de transfecção lipossomal), 2,25% (w/w) de glicerol e água para completar 100% (w/w) foram preparadas através de emulsificação espontânea. Resumidamente, uma solução etanólica contendo os componentes da fase oleosa foi lentamente adicionada à fase aquosa contendo glicerol sob agitação moderada. O excesso da mistura de solventes (etanol/água) foi removido sob pressão reduzida a 50°C até alcançar o volume final desejado (5 mL). A concentração final de lipídeo catiônico foi de 2 mM, conforme previamente otimizado.

Preparo e caracterização dos complexos NE/siRNA:

[0064] A adsorção das sequências siRNA-GFP, siRNA-CD73-961 ou siRNA-CD73-980 nas NE catiônicas foi realizada ao final do processo de produção das NEs, resultando na formação dos complexos NE/siRNA-GFP, NE/siRNA-CD73-961 ou NE/siRNA-CD73-980. Concentrações crescentes de NE foram adicionadas a soluções aquosas de sequências siRNA (1 µM – concentração final) e incubadas durante 15 min a temperatura ambiente.

[0065] NE foram escolhidas como vetores não-virais para a entrega das sequências siRNA-CD73 em alvos específicos. Após a adsorção das sequências siRNA-CD73 nas NE catiônicas, as propriedades físico-químicas dos complexos foi determinada (Tabela 2).

[0066] Os complexos foram preparados em três relações de carga +/- distintas (+0.1/-; +0.5/- e +2/-). As relações de carga foram calculadas entre o número de cargas positivas do lipídeo catiônico presente na NE e o número de cargas negativas dos grupamentos fosfato das sequências siRNA).

[0067] O tamanho médio de partícula, o potencial zeta e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por espectroscopia de correlação de

fóton e por mobilidade eletroforética (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instrument, UK), a 20°C. O complexo foi adequadamente diluído em água para as determinações de tamanho e PDI ou em solução de NaCl 1 mM para as medidas de potencial zeta.

[0068] A morfologia dos complexos NE/siRNA também foram avaliadas conforme descrito acima.. O tamanho médio de partícula da NE variou entre 249.9 a 526.52 nm e o PDI variou de 0.1 a 0.6. Os valores de potencial zeta dos complexos NE/siRNA foram menores que zero, resultando em variações no tamanho de partícula entre as preparações. De uma forma geral, as características apresentadas pelas formulações estão em acordo com outros sistemas de NE reportados na literatura.

siRNA	Relação de Carga	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de Polidispersão
NE	—	188.48 ± 25.60	45.5 ± 5.13	0.1412 ± 0.059
NE/siRNA-GFP	+0.1/-	348 ± 12.26	-42.1 ± 4.12	0.302 ± 0.074
	+0.5/-	323.5 ± 105	-32.4 ± 10.14	0.427 ± 0.154
	+2/-	294.5 ± 15.05	-21.5 ± 9.19	0.201 ± 0.024
NE/siRNA-961	+0.1/-	526.52 ± 82.99	-43.69 ± 9.30	0.67 ± 0.07
	+0.5/-	350.46 ± 80.41	-34.98 ± 17.61	0.54 ± 0.14
	+2/-	272.1 ± 6.724	-32.5 ± 0.96	0.236 ± 0.051
NE/siRNA-980	+0.1/-	414.8 ± 106.8	-41.7 ± 3.38	0.646 ± 0.093
	+0.5/-	307.4 ± 66.62	-26.7 ± 3.98	0.419 ± 0.175
	+2/-	249.9 ± 16.33	-25.9 ± 8.44	0.164 ± 0.036

Tabela 2

[0069] Para estudos de adsorção, os complexos NE/siRNA-CD73 foram preparados em duas relações de cargas distintas (+0.1/-; +0.5/-) e a microscopia eletrônica de transmissão foi realizada (Figura 3). A análise revelou que as gotas oleosas com aparência típica de emulsão óleo/água apresentam gotas de tamanho aproximado de 250-500 nm, de acordo com a caracterização físico-química. Interessantemente, os complexos NE/siRNA-CD73 mostraram elevada densidade eletrônica na interface (Figura 3, quadros C-H). É bem estabelecido que oligonucleotídeos interagem com acetato de uranila, resultando em regiões de sombreamento escuro. Esses dados indicam

que as sequências siRNA-CD73 foram adsorvidas na interface da NE.

Procedimentos de transfecção celular:

[0070] Transfecção é o processo de introdução intencional de ácido nucleico nas células. A transfecção do glioma C6 com sequências siRNA (siRNA-GFP, siRNA-CD73-961 ou siRNA-CD73-980) foi realizada utilizando Lipofectamine® (Lipofectamine RNAiMax, Invitrogen), um agente de transfecção utilizado para aumentar especificamente a eficiência da lipofecção de RNA, em culturas de glioma C6 semeadas em placas de 24 poços e com aproximadamente 70% de confluência de acordo com as instruções do fabricante.

[0071] Para a transfecção das células C6 com os complexos NE/siRNA, os complexos foram preparados conforme descrito acima e as células de glioma C6 foram transfectadas utilizando o protocolo direto e reverso. Para o protocolo direto, 2×10^4 de células C6 foram semeadas em placas de 24 poços e a mistura de transfecção foi preparada e adicionada as células no dia seguinte ao do semeio. Para o protocolo reverso, os complexos foram preparados dentro do poço da placa de cultivo de 24 poços e, após, 2×10^4 células de glioma C6 em meio de cultivo foram adicionadas. As células C6 foram expostas aos complexos por 24, 48 ou 72 h.

[0072] Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas através de Análise da variância (ANOVA) seguido de post-hoc de Tukey (Prism GraphPad Software, USA), considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

EXEMPLOS

Exemplo 1 – O Inibidor seletivo da ecto-5'-NT/CD73, AMPCP, diminui a proliferação celular de glioma C6:

[0073] Foi analisada a atividade da ecto-5'-nucleotidase/CD73 em células de glioma C6 comparativamente com astrócitos, em um modelo de células não-transformada.

[0074] Ao contrário dos astrócitos, glioma C6 apresentou uma elevada atividade AMPásica (0.013 ± 0.001 versus 0.12 ± 0.01 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ de

proteína, para astrócitos e células C6, respectivamente; Figura 1, quadro A), a qual foi acompanhada por uma elevada expressão da ecto-5'-nucleotidase/CD73 na superfície das células tumorais (Figura 1, quadro B).

[0075] Assim, foi avaliado o quanto o inibidor seletivo da ecto-5'-nucleotidase/CD73, AMPCP, poderia afetar a proliferação das células de glioma C6. As células foram expostas a concentrações crescentes de AMPCP (1, 10 e 100 μ M) e após 48 h a proliferação celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Em paralelo, a atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73 foi analisada através da medida da hidrólise do AMP até adenosina (ADO) pelo método do verde de malaquita.

[0076] O tratamento do glioma C6 com AMPCP (100 μ M) resultou em um decréscimo de 30% da proliferação celular quando comparadas ao controle (Figura 1, quadro C). Além disso, o tratamento com 10 μ M e 100 μ M de AMPCP reduziu a hidrólise de AMP em 40 e 50%, respectivamente (Figura 1, quadro D).

[0077] Esses dados indicam que a CD73 é superexpressa em gliomas e que a sua inibição farmacológica é importante para reduzir a proliferação das células tumorais.

Exemplo 2 - Novas sequências siRNA-CD73 são eficientes em reduzir a expressão ecto-5'-nucleotidase/CD73 em células de glioma:

[0078] Como o aumento da expressão da ecto-5'-nucleotidase/CD73 é um fator positivo para o desenvolvimento tumoral, incluindo o glioblastoma multiforme (Figura 1), uma segunda concretização foi a constatação de que o silenciamento dessa enzima utilizando a tecnologia do RNA de interferência poderia ser uma estratégia interessante para controlar a progressão dos gliomas.

[0079] Para essa finalidade, sequências específicas siRNA-CD73 foram desenvolvidas (siRNA-CD73-961 e siRNA-CD73-980; Tabela 1) e sua funcionalidade/especificidade foi avaliada por meio de transfecção das células C6 utilizando Lipofectamine® de acordo com as instruções do fabricante. Após

48 h da transfecção, a expressão e a atividade enzimática da CD73 foram avaliadas por imunocitoquímica e por hidrólise do AMP, respectivamente.

[0080] Células transfectadas com sequências siRNA-GFP foram utilizadas como controle. Conforme mostrado na Figura 2, as sequências siRNA-CD73 foram eficientes em reduzir a expressão (Figura 2, quadro A) e a hidrólise (Figura 2, quadro B) do AMP quando comparadas ao controle e as células transfectadas com as sequências siRNA-GFP. Além disso, o processo de transfecção *per se* não induziu citotoxicidade nas células.

[0081] Esses resultados indicam que as sequências siRNA-CD73 desenhadas foram eficientes e específicas em reduzir a expressão e a atividade da CD73 em glioma C6 e foram subsequentemente utilizadas para o desenvolvimento das nanoemulsões (NE).

Exemplo 3 - Complexos NE/SiRNA não são citotóxicos para cultura de astrócitos primários:

[0082] Considerando que as NE catiônicas têm sido associadas à toxicidade em sistemas biológicos, o protocolo de transfecção em glioma C6 foi otimizado com o objetivo de equalizar elevada taxa de transfecção e baixa toxicidade.

[0083] Para essa finalidade, complexos NE/siRNA-GFP foram preparados em três relações de carga distintas (+0.1/-; +0.5/-; +2/-) e as células C6 foram transfectadas utilizando os protocolos direto e reverso, conforme descrito em materiais e métodos. Após 24, 48 e 72 h de exposição, a viabilidade celular foi determinada por MTT (Figura 4, quadros A-F).

[0084] A transfecção direta resultou em 50% de toxicidade em glioma C6 após 48 e 72 h de exposição com os complexos quando comparado as células não-tratadas (Figura 4, quadros A-C). Para a transfecção reversa, a exposição das células C6 aos complexos NE/siRNA-GFP nas relações de carga +0.1/- e +0.5/- por 48 h não alterou a viabilidade celular (Figura 4, quadro E), enquanto a exposição por 72 h resultou em 50% de toxicidade para as relações de carga +0.5/- and +2/- (Figura 4, quadro F). Em conjunto, esses dados indicam que o protocolo de transfecção reversa resultou em menor toxicidade quando

comparado ao protocolo direto. Então, os complexos NE/siRNA-GFP em duas relações de carga (+0.1/-; +0.5/-) e o protocolo reverso por 48 h de exposição foi utilizado nos experimentos subseqüentes.

[0085] Finalmente, a toxicidade dos complexos NE/siRNA também foi avaliada em astrócitos, um modelo de célula glial não-tumoral. Astrócitos foram expostos aos complexos NE/siRNA-GFP (+0.1/-; +0.5/-) por 48 h e a viabilidade celular foi determinada por MTT. Notavelmente, os complexos não promoveram toxicidade para os astrócitos quando comparados ao controle, indicando a segurança das formulações (Figura 5).

Exemplo 4 - Os complexos NE/siRNA-CD73 são eficientes em silenciar a expressão e a atividade da ecto-5'-nucleotidase/CD73 em glioma C6:

[0086] Após a caracterização físico-química e a otimização do protocolo de transfecção, foi analisada a eficácia dos complexos NE/siRNA-CD73 em silenciar a CD73 em glioma C6 através de experimentos de imunocitoquímica e de hidrólise de AMP.

[0087] A expressão da CD73 foi significativamente menor nas células expostas aos complexos NE/siRNA-CD73 quando comparadas as células transfectadas com as sequências *scramble* (NE/siRNA-GFP) (Figuras 6, quadros A e B). Similarmente, a atividade AMPásica foi reduzida nas células silenciadas (redução de 70% e 63% para siRNA-CD73-961 e siRNA-CD73-980, respectivamente; Figura 6, quadro C). Dessa forma, os complexos NE/siRNA-CD73-961 e 980 foram eficientes e seletivos em silenciar a CD73 em glioma C6.

[0088] Além disso, a transfecção das células C6 com os complexos NE/siRNA-CD73-961 e 980 na relação de cargas +0.1/- resultou em redução de 20 e 35% da viabilidade celular, respectivamente (Figura 7). De uma forma geral, esses dados sugerem que as NE catiônicas foram eficientes em fazer a entrega das sequências siRNA-CD73 nas células de glioma C6 e que a CD73 é um alvo interessante para o tratamento dos gliomas.

[0089] O depositante, ao depositar este pedido de patente perante o órgão

competente/garante, busca e pretende: (i) nomear os inventores em respeito a seus respectivos direitos morais; (ii) indicar inequivocamente que é possuidor do segredo industrial e titular de qualquer forma de propriedade intelectual que dele derivar e o depositante desejar; (iii) descrever em detalhes o conteúdo objeto do segredo, comprovando sua existência nos planos físico e jurídico; (iv) estabelecer a relação entre os exemplos/concretizações e o conceito inventivo segundo a cognição do depositante e seu contexto, para demonstrar com clareza o alcance de seu bem intangível tutelado e/ou tutelável; (v) requerer e obter os direitos adicionais previstos para as patentes, se o depositante optar por prosseguir com o procedimento administrativo até o final.

[0090] Desde logo adverte-se que eventual uso comercial requer autorização do possuidor/titular e que o uso não autorizado enseja sanções previstas em Lei. Neste contexto, dado o amplo detalhamento segundo o qual o conceito e os exemplos foram revelados pelo depositante, os versados na arte poderão, sem muito esforço, considerar outras formas de concretizar a presente invenção de formas não idênticas às meramente exemplificadas acima. Entretanto, tais formas são ou poderão ser consideradas como dentro do escopo de uma ou mais das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Composição farmacêutica nanométrica **caracterizada** por compreender lipossomas ou nanoemulsão contendo filamentos de RNA de interferência.
2. Composição farmacêutica nanométrica de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada** pelo fato dos filamentos de RNA de interferência serem compostos por duas sequências idênticas de 19 nucleotídeos em orientação invertida, separadas por um espaço de 9 pares de bases, definidas de acordo com as SEQ ID No: 1, SEQ ID No:2 e SEQ ID No: 3.
3. Composição farmacêutica nanométrica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2 **caracterizada** por compreender adicionalmente um excipiente farmacêuticamente aceitável.
4. Composição farmacêutica nanométrica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 **caracterizada** por estar na forma de uma injeção intratumoral, parenteral ou spray nasal.
5. Uso da composição farmacêutica nanométrica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 **caracterizada** por ser para preparar um medicamento para silenciar genes responsáveis pela expressão de proteínas superexpostas em tumores.
6. Uso da composição farmacêutica nanométrica de acordo com a reivindicação 5 **caracterizada** pelo fato do gene silenciado ser o 5'-nucleotidase-ecto.
7. Uso da composição farmacêutica nanométrica de acordo com a reivindicação 5 **caracterizada** pelo fato da proteína a ser regulada ser a ecto-5'-nucleotidase/CD73.
8. Uso da composição farmacêutica nanométrica de acordo com a reivindicação 5 **caracterizada** pelo fato do tumor ser o glioblastoma multiforme.
9. Uso da composição farmacêutica nanométrica de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8 **caracterizado** por ser administrada na forma de uma injeção intratumoral, parenteral ou spray nasal.

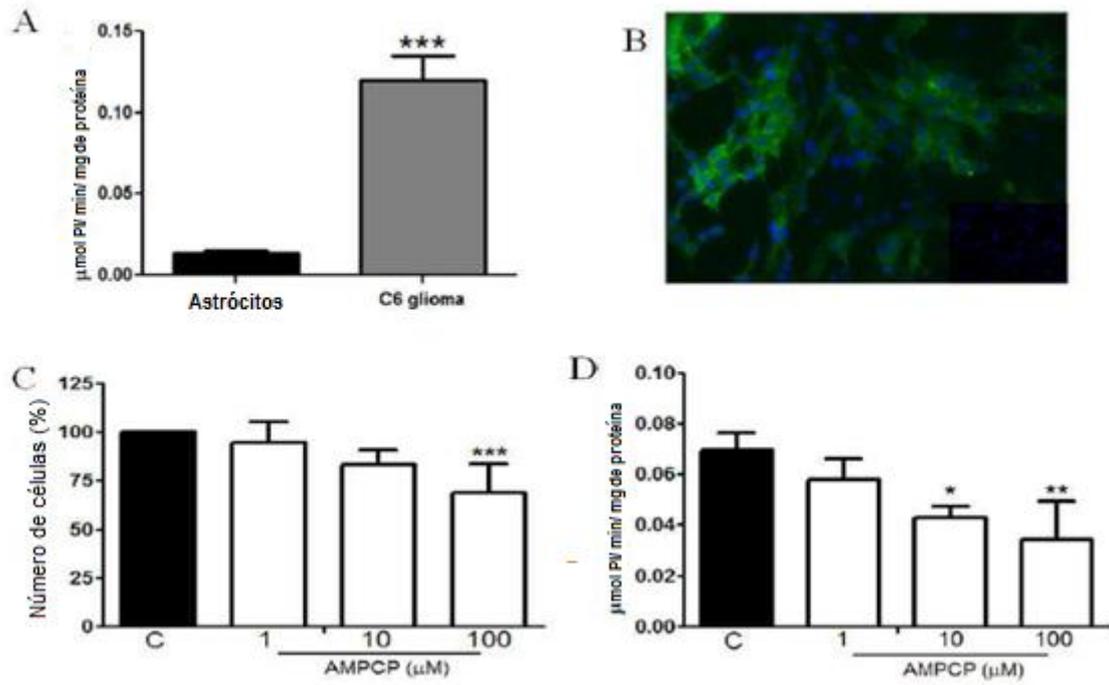
Figuras

Figura 1

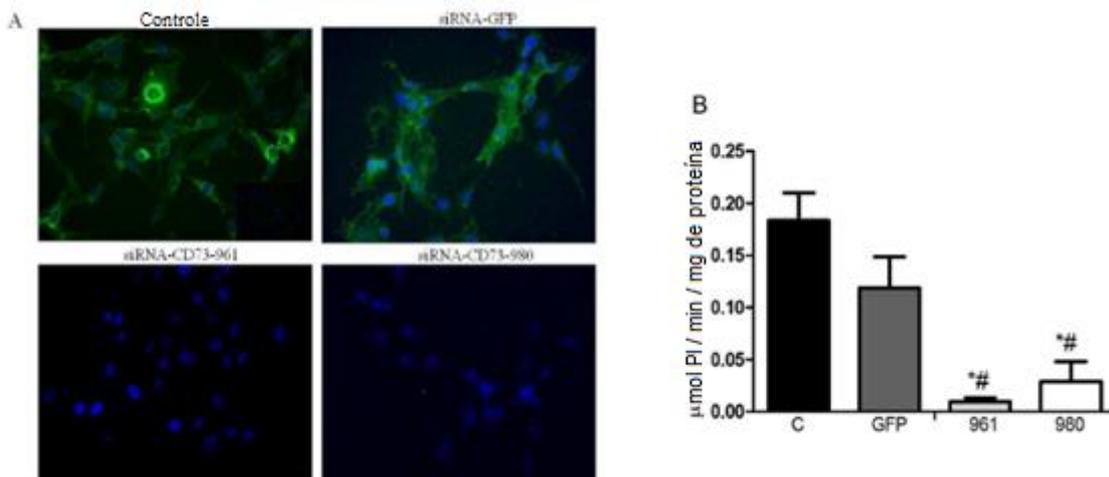


Figura 2

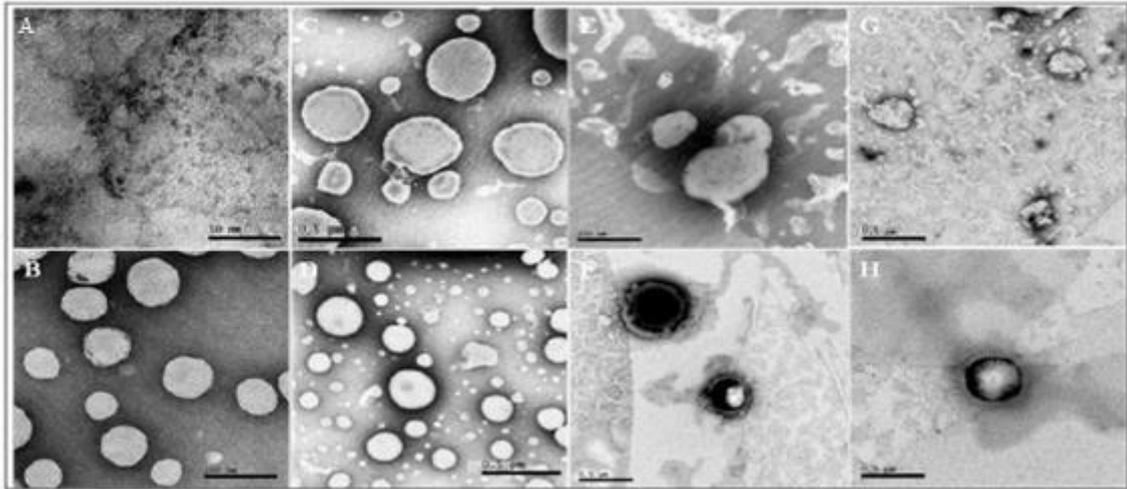


Figura 3

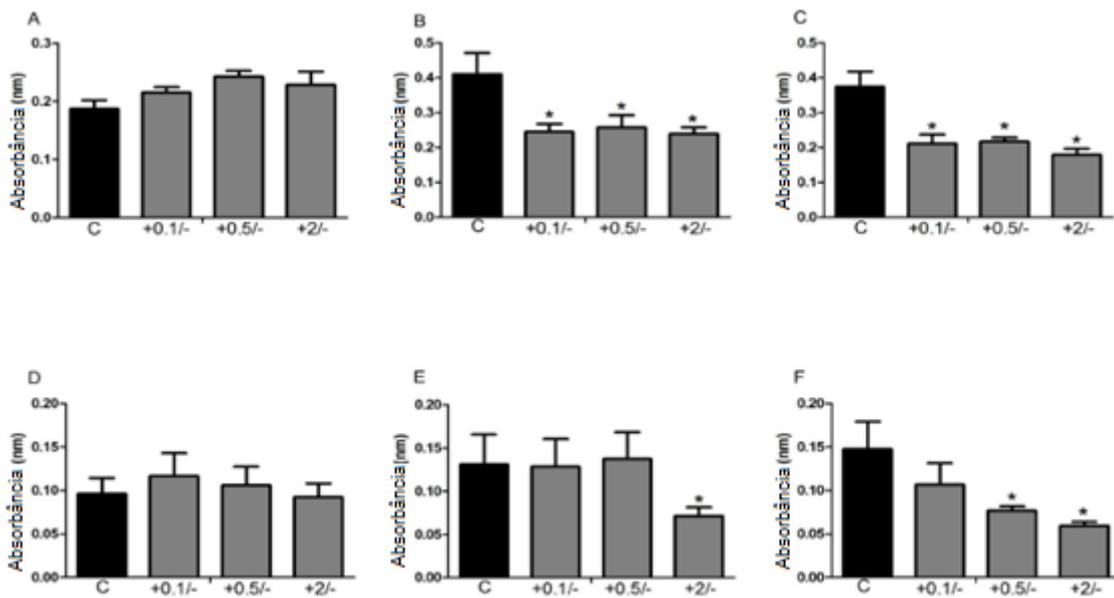


Figura 4

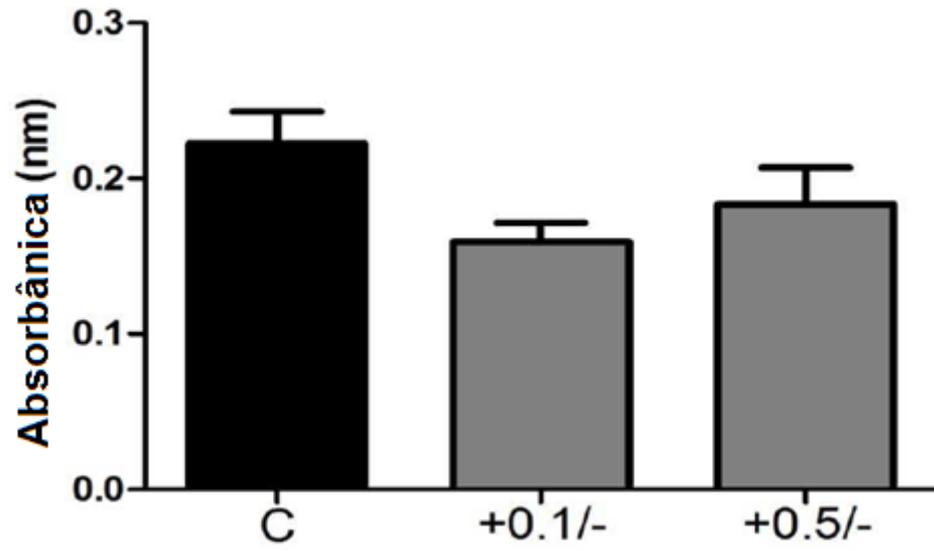


Figura 5

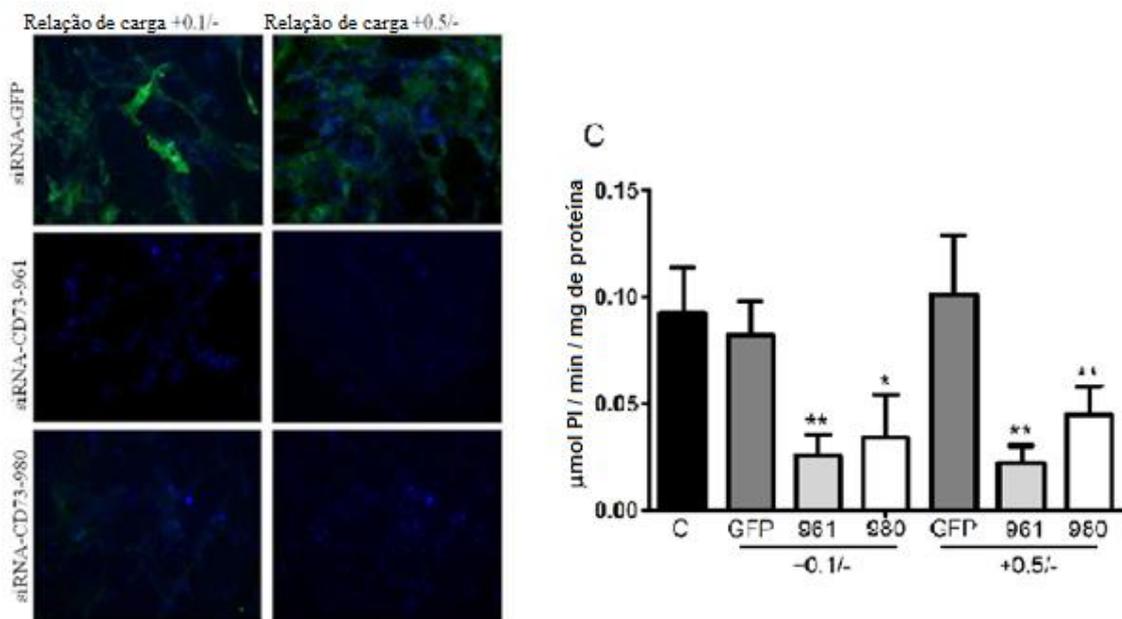


Figura 6

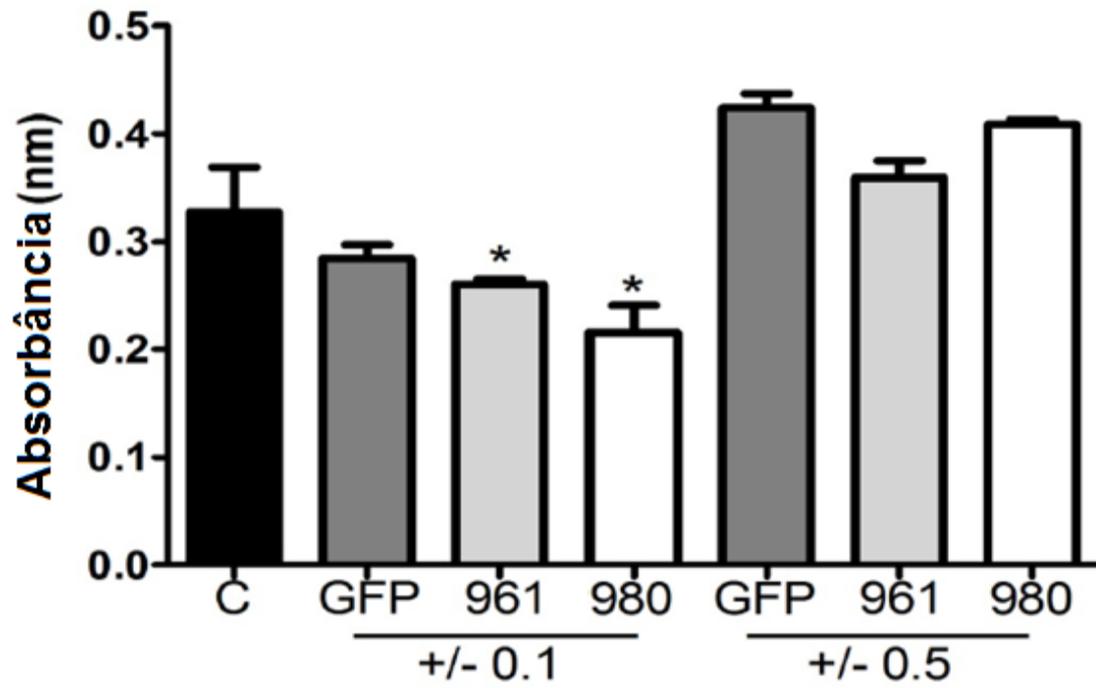


Figura 7

Resumo**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA DE LIBERAÇÃO DE
MOLÉCULAS DE RNA DE INTERFERÊNCIA E USO DA MESMA**

A presente invenção refere-se a uma composição em escala nanométrica na forma de lipossomas ou nanoemulsões contendo filamentos de RNA de interferência (siRNA) capazes de silenciar o gene responsável pela expressão de proteínas de adesão superexpostas em tumores, como a enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73 (CD73) superexpressa no glioblastoma multiforme e em outros tipos de tumores. A união dos lipossomas ou nanoemulsões com o siRNA promove um complexo de liberação sitio-direcionado capaz de ser incorporado a diversos tipos de formulação, como injeção intratumoral, intravenosa ou administração nasal.