



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

(21) BR 102017016440-3 A2



(22) Data do Depósito: 31/07/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 19/03/2019

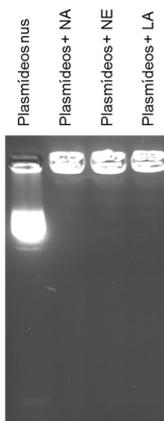
(54) **Título:** COMPOSIÇÃO PARA TERAPIA GÊNICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA

(51) **Int. Cl.:** A61K 48/00; A61K 9/51; A61K 9/127; A61P 25/00; C12N 15/113; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

(72) **Inventor(es):** ROSELENA SILVESTRI SCHUH; HELDER FERREIRA TEIXEIRA; GUILHERME BALDO; URSULA DA SILVEIRA MATTE; ROBERTO GIUGLIANI; JULIANA BÍDONE.

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO PARA TERAPIA GÊNICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA. A presente invenção descreve uma composição para terapia gênica do sistema nervoso central compreendendo carreadores não-virais de tamanho nanométrico ( 1,0 micrômetro) complexados com ao menos um ácido nucleico para fins de terapia gênica via administração nasal tendo como alvo principal o sistema nervoso central, e ainda os processos de obtenção de tais carreadores. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia e consiste em formulações aquosas que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica e médica.



## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

### COMPOSIÇÃO PARA TERAPIA GÊNICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA

#### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção descreve uma composição para terapia gênica do sistema nervoso central compreendendo carreadores não-virais de tamanho nanométrico ( $< 1,0$  micrômetro) complexados com ao menos um ácido nucleico para fins de terapia gênica via administração nasal tendo como alvo principal o sistema nervoso central, e ainda os processos de obtenção de tais carreadores. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia e consiste em formulações aquosas que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica e médica.

#### **Antecedentes da Invenção**

**[0002]** Deficiências e/ou anomalias genéticas (mutação, expressão aberrante, etc) estão envolvidas na origem de numerosas doenças, de caráter hereditário ou não. A medicina convencional é limitada para tratar essas doenças, utilizando-se de terapias para amenização dos sintomas. Mais recentemente, surgiu a terapia gênica, que consiste na inserção de um gene funcional a fim de corrigir uma disfunção celular ou prover novas funções à célula, com a introdução do material genético diretamente nas células do paciente (*in vivo*), ou a partir da administração das células após modificação *in vitro* (*ex vivo*). A terapia gênica é definida como a modificação genética de células com a intenção de alterar a expressão de algum gene para prevenir, impedir ou reverter um processo patológico (KAY, M. A. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. Nature Reviews Genetics 2011, v. 12, p. 316–328).

**[0003]** Entretanto, apesar de promissora, a terapia gênica enfrenta diversas limitações relacionadas à capacidade de penetração e estabilidade

intracelular dos ácidos nucleicos, devido a seu caráter altamente polianiónico, à possibilidade de interação e agregação com proteínas, e à ocorrência de degradação enzimática (LIU, C.-H.; YU, S.-Y. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 2010, v. 79, n. 2, p. 509–515). Com o intuito de transpor essas dificuldades, algumas estratégias têm sido utilizadas, como a veiculação dos ácidos nucleicos mediante a associação a vetores virais e/ou não-virais.

**[0004]** Os vetores virais mais utilizados em terapia gênica são adenovírus, vírus adenoassociados, lentivírus e retrovírus. Apesar da grande eficiência de inserção e transdução oferecidas pelos vetores virais, eles apresentam alguns problemas relacionados à imunogenicidade, replicação e segurança (YIN, H. et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics* 2014, v. 15, n. 8, p. 541–545). Para contornar esses problemas, faz-se uso dos vetores não-virais, que possuem relativa facilidade e baixo custo de produção em larga escala, menor toxicidade, baixa imunogenicidade, capacidade de complexar com ácidos nucleicos de alto peso molecular, maior segurança e boa capacidade de transfecção (NAM, H. Y. et al. Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers. *Archives of Pharmaceutical Research* 2009, v. 32, n. 5, p. 639–646; NORDLING-DAVID, M. M.; GOLOMB, G. Gene Delivery by Liposomes. *Israel Journal of Chemistry* 2013, v. 53, n. 9-10, SI, p. 737–747).

**[0005]** A transfecção mediante o uso de vetores não-virais pode ocorrer através de estruturas poliméricas ou lipídicas, sendo as últimas mais clássicas e mais seguras no que se refere à toxicidade, à biocompatibilidade e biodegradabilidade dos biomateriais utilizados. Entre os vetores baseados em lipídeos catiônicos, os mais descritos na literatura são lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados. Os lipossomas catiônicos (NORDLING-DAVID, M. M.; GOLOMB, G. Gene Delivery by Liposomes. *Israel Journal of Chemistry* 2013, v. 53, n. 9–10, SI, p. 737–747) e as nanoemulsões catiônicas (BRUXEL, F. et

al. Investigation of the structural organization of cationic nanoemulsion/antisense oligonucleotide complexes. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2013, v. 112, p. 530–536) estão dentre os vetores lipídicos não-virais mais descritos. Os lipossomas podem ser definidos como dispersões aquosas de uma mistura de fosfolipídios, organizadas na forma de bicamadas e com um núcleo aquoso central. Já as nanoemulsões, as nanopartículas lipídicas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados, organizam-se como monocamadas com um núcleo lipídico respectivamente líquido, sólido, ou ambos, dispersas em uma fase aquosa (geralmente do tipo O/A), e estabilizadas por um filme interfacial constituído por emulsificantes fosfolipídicos (SCHUH, R. S.; BRUXEL, F.; TEIXEIRA, H. F. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. *Química Nova* 2014, v. 37, p. 1193–1198).

**[0006]** Independentemente da estrutura formada, esses sistemas não-virais contêm um lipídio catiônico (normalmente uma amina quaternária) que forma um par iônico (complexo) com os grupamentos fosfato negativamente carregados dos ácidos nucleicos. Diversos estudos demonstram a eficiência desses complexos formados por nanoestruturas lipídicas/ácidos nucleicos (NORDLING-DAVID, M. M.; GOLOMB, G. Gene Delivery by Liposomes. *Israel Journal of Chemistry* 2013, v. 53, n. 9–10, SI, p. 737–747; FRAGA, M. et al. PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model. *Journal of Controlled Release* 2015, v. 209, p. 37–46). Entretanto, algumas limitações relacionadas à liberação dos ácidos nucleicos *in vivo*, devido à captura dos complexos pelo sistema fagocítico mononuclear e sua limitada biodistribuição, exigem algumas estratégias de formulação. Dentre essas, a incorporação de fosfolipídios ligados covalentemente a polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG) parece conferir um maior tempo de circulação aos complexos e uma maior proteção dos ácidos nucleicos, o que possibilita o

aumento da sua biodistribuição nos tecidos e conseqüentemente, da eficiência de transfecção (FRAGA, M. et al. PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model. *Journal of Controlled Release* 2015, v. 209, p. 37–46).

**[0007]** Além disso, a utilização de policátions como a quitosana em formulações para administração é ampla, especialmente devido a suas propriedades muco adesivas, especialmente quando o alvo é a administração nasal visando o tratamento de desordens do sistema nervoso central (Khatri, K. et al. Surface modified liposomes for nasal delivery of DNA vaccine. *Vaccine*, 2008, v. 26(18), p. 2225-33).

**[0008]** As possibilidades de tratamento de doenças geradas pela terapia gênica são inúmeras, e seu carreamento através de vetores não-virais aumenta muito as chances de sucesso, porém a chegada dessas composições no sistema nervoso central continua sendo um desafio. O cérebro é um órgão exclusivamente protegido que reside dentro dos limites ósseos do crânio, tornando difícil seu alcance através da entrega sistêmica de medicamentos. Uma variedade de obstáculos protege o sistema nervoso central e ao mesmo tempo impede a chegada de medicamentos ao cérebro e medula espinhal e incluem a barreira hemato encefálica (BHE) e a barreira do líquido cefalorraquidiano (BLCR). As barreiras sangue-cérebro restringem a difusão passiva de macromoléculas ao cérebro e constituem um obstáculo significativo ao cérebro / sistema nervoso central (SNC) no tratamento farmacológico de doenças genéticas com acometimento neurológico, e entre elas estão as doenças lisossômicas de depósito (Saraiva, C. et al. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, 2016, v. 235, p. 34-47).

**[0009]** Métodos invasivos de tratamento do SNC incluem a administração intracraniana direta de fármacos por administração intracerebroventricular, intracerebral ou intratecal, e criam buracos na cabeça

que interrompem a integridade da barreira hematoencefálica pela ruptura osmótica da barreira cerebral do sangue.

**[0010]** Assim, a via nasal passou a ser explorada como um método não-invasivo para contornar a BHE para o transporte de fármacos para o SNC e tem sido comprovadamente efetiva para um número de pequenas moléculas e peptídeos. Essa via de administração de fármacos funciona devido à ligação neuronal única que os nervos trigêmeo e olfativo possuem entre a cavidade nasal, o líquido cefalorraquidiano (LCR) e o cérebro.

**[0011]** Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

**[0012]** As tecnologias protegidas pelos números WO 2015089419 (A2) 18/06/2015, e WO2014093622 (A2) 19/06/2014, descrevem a utilização de partículas para entrega do sistema CRISPR/Cas. Os lipossomas das tecnologias protegidas são produzidos por um método de extrusão através de membrana ou formação espontânea pela hidratação do filme lipídico (Coelho et al, N Engl J Med 2013, v. 369, p. 819-29; Basha et al, Molecular Therapy 2011, v. 19(12), p. 1286-00; Morrissey et al, Nature Biotechnology 2005, v. 23(8), p. 1002-07; Zimrnerrnan et al, Nature Letters 2006, v. 441(4), p. 111-14; Geisbert et al, Lancet 2010, v. 375, p. 1896-905; Semple et al, Nature Nanotechnology 2010, v. 28(2), p. 172-177; Jayaraman A., Chem. Int. Ed. 2012, v. 51 , p. 8529-33; U.S. Pat. Nos. 5593972, 5589466 e 5580859). A tecnologia protegida também cita nanoplexos (Bartlett et al, PNAS 2007, v. 104(39), p. 15549-54) e um sistema de entrega baseado em nanopartículas (Davis et al, Nature 2010, v. 464(15), p. 1067-70), que utilizam ciclodextrinas em sua composição, diferindo da presente invenção. As nanopartículas citadas contém polímeros, diferindo da presente invenção.

**[0013]** A tecnologia WO 2016197133 (A1) descreve como entregar o sistema CRISPR com nanopartículas lipídicas, porém não descreve a complexação com duas sequências de ácidos nucleicos diferentes ou

proteínas.

**[0014]** A tecnologia protegida sob o número WO 2015191693 (A2) 17/12/2015, propõe a utilização de dois vetores diferentes, sendo que um carrega o RNA guia e outro o sistema de edição de genoma, além de lipossomas e nanopartículas poliméricas produzidas por métodos diferentes dos mencionados na presente invenção.

**[0015]** A tecnologia protegida sob o número WO 2015US23882 (A2) descreve métodos e composições para a prevenção ou tratamento de desordens do sistema nervoso central, porém não descreve a utilização de carreadores lipídicos para tal fim.

**[0016]** A tecnologia EP 3087974 (A1) descreve nanocarreadores para entrega de uma composição editora de genoma, porém só cita lipossomas e micelas, e estes possuem uma molécula ligante de algum receptor específico.

**[0017]** A tecnologia protegida sob o número WO 2015089462 (A1) descreve composições nanoparticuladas lipídicas para entrega de CRISPR, porém é composta somente por moléculas de RNA e não cita composições contendo diferentes ácidos nucleicos e proteínas. Também determina uma razão de lipídio:gRNA de 5:1 a 15:1, diferente das proposições do presente invento.

**[0018]** A tecnologia WO 2013188979 (A1) refere-se, de um modo geral, a nanopartículas mucoadesivas formadas a partir de macromoléculas poliméricas anfifílicas conjugadas a um revestimento polimérico para entrega de medicamentos em geral, porém não utiliza lipídeos em sua composição principal.

**[0019]** A tecnologia IN2011MU01507 apresenta uma composição farmacêutica compreendendo fármaco ou veículo de fármaco que após administração intranasal conduz a uma melhora na captação cerebral do fármaco mediada por receptor, porém não versa sobre a entrega de ácidos nucleicos.

**[0020]** A tecnologia protegida sob o número WO 200641942 (A2)

descreve uma composição que pode ser utilizada como implante biodegradável.

**[0021]** A tecnologia WO2016174250 (A1) refere-se a nanocarreadores com ligantes de ancoragem para entregar uma ferramenta para a transferência gênica a células. As âncoras possuem uma porção de direcionamento que pode ser um carboidrato, um anticorpo ou um fragmento de anticorpo, uma proteína, um aptâmero, entre outros.

**[0022]** A tecnologia protegida sob o número WO2015179492 (A1) demonstra processos para a preparação de nanopartículas poliméricas contendo ácidos nucleicos para tratamento de doenças neurológicas. Esse processo não utiliza componentes lipídicos em sua produção.

**[0023]** A tecnologia WO2015117021 (A1) refere-se em parte a métodos para entrega de ácidos nucleicos, porém possui como alvo principal a pele.

**[0024]** A tecnologia WO2012135805 (A1) descreve uma composição farmacêutica para entrega de polinucleotídeos porém não determina a entrega de duas sequências de ácidos nucleicos concomitantemente.

**[0025]** Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

### **Sumário da Invenção**

**[0026]** Dessa forma, a presente invenção difere do estado da técnica, compreendendo a utilização de quatro diferentes tipos de carreadores nanométricos aquosos, produzidos por métodos distintos dos mencionados no estado da técnica, contendo ao menos um ácido nucleico complexado na mesma formulação, para administração nasal tendo como alvo o SNC para fins de terapia gênica.

**[0027]** A tecnologia descrita no presente invento fornece novas composições e métodos para tratar síndromes que acometem principalmente o

sistema nervoso central. Em algumas formas de realização da seguinte invenção, ela pode ser administrada desde uma vez ao dia até diversas vezes ao dia durante vários dias.

**[0028]** Em algumas realizações, as composições para terapia gênica do sistema nervoso central podem ser administradas como spray intranasal ou intratraqueal para entrega cerebral, por via inalatória, e/ou por meio de outros veículos aerossóis.

**[0029]** A presente invenção também apresenta a incorporação de um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 juntamente com outro ácido nucleico.

**[0030]** A presente invenção também apresenta a incorporação de um plasmídeo recombinante codificante para uma proteína.

**[0031]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma composição para terapia gênica do sistema nervoso central compreendendo ao menos um ácido nucleico adsorvido ou encapsulado e carreadores não-virais, com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,001 a 1,0 micrômetro.

**[0032]** Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, onde a obtenção de carreadores não-virais compreende as etapas de:

(a) dissolver entre 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica em uma solução orgânica;

(b) dissolver entre 0,1% p/p a 5,0% p/p de agente de tonicidade em uma solução aquosa;

(c) evaporar a solução orgânica obtida na etapa (a), para formar um filme;

(d) adicionar a solução aquosa obtida na etapa (b) ao filme lipídico obtido na etapa (c);

(e) deixar descansar o produto obtido na etapa (d) por 4 a 72 horas em uma temperatura entre 2°C e 20°C;

(f) sonicar a formulação obtida na etapa (e) por 1 a 60 minutos a uma

temperatura entre 25°C e 50°C;

(g) homogeneizar a formulação obtida na etapa (f) em um homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada;

(h) ácidos nucleicos para proporções entre +2/-1 e +10/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO); e

(i) adicionar uma solução de polycations com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL.

**[0033]** Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central para obtenção de carreadores não-virais, incluindo nanoestruturas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os ácidos nucleicos adsorvidos, compreendendo as etapas de:

(a) fundir de 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica a uma temperatura entre 30° C e 80° C;

(b) dissolver, de 1,0% p/p a 5% p/p de tensoativo e de 0,1% p/p a 5,0% p/p de um agente de tonicidade em uma solução aquosa, com temperatura de 30° C a 80° C;

(c) adicionar a solução aquosa da etapa (A) na solução oleosa da etapa (B), sob agitação e com temperatura de 30° C a 80° C;

(d) agitar o produto obtido em (C) em dispersor ultra-turrax, a uma velocidade entre 500 e 25000 rpm, sob aquecimento de 30° C a 80° C, durante 30 segundos a 10 minutos; e

(e) homogeneizar a formulação obtida em (D) em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada;

(f) ácidos nucleicos para proporções entre +2/-1 e +10/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO); e

(g) adicionar uma solução de polycations com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL.

**[0034]** Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso da

composição para terapia gênica do sistema nervoso central no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por deficiências ou anomalias genéticas como as doenças lisossômicas de depósito.

**[0035]** Ainda, os conceitos inventivos comuns a todos os contextos de proteção reivindicam uma composição para terapia gênica do sistema nervoso central, compreendendo carreadores não-virais de tamanho manométrico e ao menos um ácido nucleico adsorvido ou encapsulado com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,001 a 1,0 micrômetro.

**[0036]** Ainda, as composições poderão ser incorporadas em forma de solução, suspensão, gel, pó, entre outras.

**[0037]** Esses e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

**[0038]** Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras:

**[0039]** A figura 1 demonstra a co-complexação das formulações com um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e um plasmídeo doador da sequência da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA) utilizado para reparação do genoma por recombinação homóloga após clivagem pela Cas9, direcionado ao locus Rosa 26 de camundongos. Podem ser observadas bandas dos plasmídeos nus, e pode-se observar que as formulações nanoemulsão com ácidos nucleicos adsorvidos (NA), nanoemulsão com ácidos nucleicos encapsulados (NE) e lipossomas com ácidos nucleicos adsorvidos (LA) complexaram os plasmídeos que não migraram no gel, demonstrando 100% de complexação pois permaneceram no ponto de aplicação. A taxa de 100% foi calculada através do software ImageJ®.

**[0040]** A figura 2 mostra os valores de atividade enzimática de IDUA

murina encontrada no soro de camundongos MPS I não tratados, e em camundongos MPS I tratados com o complexo LA CRISPR/pROSA26 ou com os plasmídeos CRISPR/pROSA26 nus, por via nasal durante 15 dias. Valores relativos à atividade enzimática de camundongos normais.

**[0041]** A figura 3 mostra os valores de atividade enzimática de IDUA murina encontrada em diferentes secções do cérebro de camundongos MPS I não tratados e em camundongos MPS I tratados com o complexo LA CRISPR/pROSA26 ou com os plasmídeos CRISPR/pROSA26 nus por via nasal durante 30 dias. Valores relativos à atividade enzimática de camundongos normais.

**[0042]** A figura 4 demonstra a co-complexação das formulações com um plasmídeo (pIDUA) contendo o cDNA da *IDUA* construído usando o vetor de expressão comercial pREP9 (Invitrogen, USA) como descrito por Camassola e colaboradores (M. Camassola, L.M. Braga, A. Delgado-Cañedo, T.P. Dalberto, U. Matte, M. Burin, R. Giugliani, N.B. Nardi, Nonviral in vivo gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2005) 1035–1043). Podem ser observadas bandas dos plasmídeos nus, e pode-se observar que as formulações nanoemulsão com ácidos nucleicos adsorvidos (NA) e a nanoemulsão com ácidos nucleicos encapsulados (NE) complexaram os plasmídeos que não migraram no gel, demonstrando 100% de complexação pois permaneceram no ponto de aplicação. A taxa de 100% foi calculada através do software ImageJ®.

**[0043]** A figura 5 mostra os valores de atividade enzimática de IDUA encontrada em diferentes órgãos e mais precisamente no cérebro de camundongos MPS I não tratados e em camundongos MPS I tratados com o complexo NA/pIDUA por via nasal em uma aplicação. Valores relativos à atividade enzimática de camundongos normais.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0044]** A terapia gênica permite a um organismo produzir uma proteína

deficiente que é essencial para seu funcionamento adequado através da administração de sequências de ácidos nucleicos que codificam para a proteína em questão. Para tal feito pode-se utilizar um plasmídeo recombinante que possua a sequência correta da proteína anormal e seja capaz de superexpressá-la ou ainda pode-se lançar mão das tecnologias de edição gênica. Em concretizações preferenciais, o plasmídeo recombinante está complexado a um carreador que será administrado pela via nasal.

**[0045]** A tecnologia de edição de genoma possibilita a modificação de sequências específicas do genoma através do reconhecimento da região que se deseja alterar e da utilização de nucleases capazes de clivar no local alvo. A manipulação genômica tem gerado expectativas, pois torna possível visar qualquer gene alvo, e assim aumenta as chances de tratamento para doenças genéticas. Para isso, são utilizados sistemas compostos por um domínio de reconhecimento e ligação a sequências específicas do DNA genômico unido a um domínio de clivagem da sequência alvo no DNA (COX, D. B. T.; PLATT, R.J.; ZHANG, F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature Medicine* 2015, v. 21, n. 2, p. 121–131).

**[0046]** As plataformas de edição de genoma são baseadas em proteínas nucleases direcionadas para clivagem de sítios alvo no genoma. A nuclease pode ser uma nuclease efetora tipo ativadora de transcrição (TALEN), uma nuclease dedo de zinco (ZFN), uma meganuclease ou uma nuclease associada a CRISPR (Cas). Em algumas concretizações essas nucleases são entregues em forma de sequências de ácidos nucleicos (plasmídeos ou oligonucleotídeos) codificantes para essas proteínas. Em algumas concretizações, a proteína é uma nuclease associada a CRISPR e é fornecida como parte de uma ribonucleoproteína (RNP) que inclui uma proteína Cas9 recombinante combinada com RNA guia (gRNA), que guia a nuclease até o sítio alvo de clivagem no genoma.

**[0047]** O ácido nucleico a ser entregue pode ser o DNA de um vetor plasmideal, o RNA mensageiro (mRNA) ou o gRNA que codifica uma enzima

ou faz parte da enzima que atuará clivando o material genético alvo, ou ainda pode ser uma sequência modelo utilizada para reparação do genoma alvo por recombinação homóloga. Onde o alvo no genoma inclui qualquer sequência que possa ser modificada para promover o silenciamento, a expressão ou superexpressão de proteínas. Em concretizações preferenciais, o ácido nucleico estará complexado a um carreador lipídico que será administrado pela via nasal.

**[0048]** A nuclease segmentável pode ser uma nuclease efetora tipo ativadora de transcrição (TALEN), uma nuclease de dedo de zinco (ZFN), uma meganuclease ou uma nuclease associada a CRISPR (Cas). Em algumas concretizações, a nuclease segmentável é uma nuclease associada a CRISPR e é fornecida como parte de uma RNP que inclui uma proteína Cas9 recombinante combinada com o gRNA. Em concretizações preferenciais, a nuclease segmentável está complexada a um carreador que será administrado pela via nasal.

**[0049]** Entretanto, algumas doenças possuem acometimento do SNC e necessitam da chegada do tratamento ao cérebro. Para a administração dos vetores não-virais contendo um plasmídeo recombinante ou o sistema CRISPR/Cas9 visando à terapia gênica de doenças com acometimento do SNC, sugere-se a via nasal, que é uma região altamente vascularizada, de fácil acesso e não invasiva. Além de ser uma via avaliada para absorção sistêmica, mais recentemente tem sido estudada como via de passagem direta de moléculas ao cérebro (GHORI, M. U. et al. Nasal Drug Delivery Systems: An Overview. American Journal of Pharmacological Sciences, v. 3, n. 5, p. 110–119, 18 dez. 2015.). Existem diversos relatos da satisfatória passagem de macromoléculas através da barreira hematoencefálica após administração nasal. Esta rota envolve o sistema olfatório que inicia no cérebro e termina na cavidade nasal, no epitélio respiratório, sendo a única região do sistema nervoso central considerada de fácil acesso (LOCHHEAD, J. J.; THORNE, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. Advanced drug

delivery reviews, v. 64, n. 7, p. 614–628, maio 2012.).

**[0050]** Para que os carreadores cheguem principalmente ao sistema nervoso, a administração nasal pode se dar através de spray intranasal ou intratraqueal, por via inalatória, e/ou por meio de outros veículos aerossóis. E ainda, as composições poderão ser incorporadas em forma de solução, suspensão, gel, pó, entre outras.

**[0051]** Desta forma, a invenção proporciona métodos e composições que permitem a produção de uma proteína deficiente por um indivíduo através da administração nasal de carreadores não-virais contendo uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína ou ainda uma nuclease que cliva o material genético alvo.

**[0052]** Face ao exposto, considerando a baixa penetrabilidade intracelular dos ácidos nucleicos nus, juntamente com as vantagens do uso de sistemas nanométricos no transporte e administração de ácidos nucleicos, juntamente com as potencialidades biológicas da administração desses complexos, a presente invenção refere-se a formulações aquosas compreendendo ao menos um ácido nucleico complexado a carreadores não-virais de diâmetro médio de gotícula/partícula inferior a 1,0 micrômetro. Os nanocarreadores da presente invenção compreendem nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.

**[0053]** O processo de fabricação dos produtos compreende uma etapa de homogeneização a alta pressão ou microfluidização, a fim de produzir carreadores lipídicos nanométricos de tamanhos uniformes e com alta estabilidade. Além disso, o processo de fabricação das nanoemulsões pode compreender uma etapa de pré-complexação com os ácidos nucleicos, que confere maior proteção contra degradação. Já o processo de fabricação dos lipossomas passa por uma etapa adicional de extrusão manual que confere alta estabilidade aos produtos. Os carreadores contendo ao menos um ácido nucleico para edição de genoma devem ser utilizados preferencialmente por

administração nasal.

**[0054]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma composição para terapia gênica do sistema nervoso central compreendendo ao menos um ácido nucleico adsorvido ou encapsulado e carreadores não-virais, com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,001 a 1,0 micrômetro.

**[0055]** Em uma concretização, os ácidos nucleicos são um ou mais selecionados do grupo que consiste em: plasmídeo recombinante contendo a sequência inteira de um gene, sequência de RNA guia, sequência codificadora de nuclease, sequência de DNA modelo para recombinação homóloga ou sequência inteira de um gene.

**[0056]** Em uma concretização, a composição para terapia gênica do sistema nervoso central compreende uma nuclease, que pode ser a Cas9.

**[0057]** Em uma concretização, as nanoestruturas são nanoemulsões com ácidos nucleicos adsorvidos ou encapsulados, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados.

**[0058]** Em uma concretização, a composição para terapia gênica do sistema nervoso central compreende excipientes farmacologicamente adequados.

**[0059]** Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, onde a obtenção de carreadores compreende as etapas de:

(a) dissolver entre 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica em uma solução orgânica;

(b) dissolver entre 0,1% p/p a 5,0% p/p de agente de tonicidade em uma solução aquosa;

(c) evaporar a solução orgânica obtida na etapa (a), para formar um filme;

(d) adicionar a solução aquosa obtida na etapa (b) ao filme lipídico obtido na etapa (c);

(e) deixar descansar o produto obtido na etapa (d) por 4 a 72 horas em uma temperatura entre 2°C e 20°C;

(f) sonicar a formulação obtida na etapa (e) por 1 a 60 minutos a uma temperatura entre 25°C e 50°C;

(g) homogeneizar a formulação obtida na etapa (f) em um homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada; e

(h) adicionar uma solução de polications com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL.

**[0060]** Em uma concretização, a solução orgânica descrita na etapa (a) é um solvente orgânico apolar.

**[0061]** Em uma concretização, caso o produto a ser obtido seja o lipossoma, o processo compreende a etapa adicional:

(i) extrusar a formulação obtida na etapa (g) em ao menos uma membrana com tamanho de poro de 1000 nm a 220 nm e em ao menos uma membrana com tamanho de poro de 220 nm a 50 nm.

**[0062]** Em uma concretização, a solução orgânica é um solvente orgânico escolhido do grupo que compreende solventes orgânicos polares próticos, apróticos ou apolares e/ou mistura dos mesmos.

**[0063]** Em uma concretização, uma solução de polications não-lipídicos poderá ser adicionada após a formação das nanoestruturas.

**[0064]** Em uma concretização, para a obtenção de nanoemulsões contendo os ácidos nucleicos encapsulados, a solução orgânica descrita na etapa (a) é a fase orgânica do pré-complexo obtido através das etapas:

(i) dissolver de 0,1% p/p a 5,0% p/p de lipídeo catiônico e ácidos nucleicos em uma mistura monofásica de solventes apolar:prótico:prótico (1:2,1:1) por 30 minutos;

(ii) adicionar ao produto obtido na etapa (i) 2 mL de solvente apolar e 2 mL de solvente prótico;

(iii) agitar o produto obtido na etapa (ii) brevemente em vórtex;

(iv) centrifugar o produto obtido na etapa (iii) a uma pressão entre 1000 e 4000 x g durante 2 a 30 min em uma temperatura entre 15 a 35°C; e

(v) separar a fase orgânica obtida na etapa (iv).

**[0065]** Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central para obtenção de nanoestruturas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os ácidos nucleicos adsorvidos, compreendendo as etapas de:

(A) fundir de 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica a uma temperatura entre 30° C e 80° C;

(B) dissolver, de 1,0% p/p a 5% p/p de tensoativo e de 0,1% p/p a 5,0% p/p de um agente de tonicidade em uma solução aquosa, com temperatura de 30° C a 80° C;

(C) adicionar a solução aquosa da etapa (A) na solução oleosa da etapa (B), sob agitação e com temperatura de 30° C a 80° C;

(D) agitar o produto obtido em (C) em dispersor ultra-turrax, a uma velocidade entre 500 e 25000 rpm, sob aquecimento de 30° C a 80° C, durante 30 segundos a 5 minutos;

(E) homogeneizar a formulação obtida em (D) em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada; e

(F) adicionar uma solução de polications com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL.

**[0066]** Em uma concretização, a formulação é submetida à etapa posterior de evaporação da água sob pressão normal ou reduzida entre 0 e 1000 mbar a uma temperatura entre 10°C e 50°C.

**[0067]** Em uma concretização, o solvente orgânico polar prótico é metanol, e o solvente orgânico apolar é clorofórmio.

**[0068]** Em uma concretização, uma solução de polications não-lipídicos poderá ser adicionada após a formação das nanoestruturas lipídicas.

**[0069]** Em uma concretização, a fase lipídica é escolhida do grupo que

compreende:

a) lipídeos líquidos tais como oleato de decila, isohexadecano, ésteres do ácido esteárico e/ou oléico, etanolamida de ácido graxo de coco, óleos naturais, como o óleo de milho, amendoim, sésamo, oliva, jojoba, soja, álcool graxo, parafina, triglicerídeos de cadeia média, triglicerídeos de cadeia longa, palmitatos, miristatos e octildodecanol;

b) lipídeos sólidos tais como triestearina, tricaprina, trilaurina, trimiristina, tripalmitina, ácido esteárico, álcool cetílico, álcool estearílico, mateiga de cacau, cera de carnaúba, cera de abelhas, palmitato de cetila, monoestearato de glicerila, behenato de glicerila, palmitoestearato de glicerila, tripalmitato de glicerila, trimiristato de glicerila, triestearato de glicerila e/ou mistura destes;

c) tensoativos lipofílicos tais como lecitinas e fosfolipídeos e/ou mistura dos mesmos;

d) lipídeos neutros;

e) lipídeos catiônicos; e

f) lipídios com ramificação de PEG (peguilados).

**[0070]** Em uma concretização, o agente de tonicidade ser escolhido do grupo que compreende sorbitol, etilenoglicol, polietilenoglicol, manitol, glicerol, e/ou mistura destes.

**[0071]** Em uma concretização, a solução de polications não-lipídicos na concentração de 0,001mg/mL (p/v) a 10mg/mL (p/v), compreende a quitosana, brometo de hexadimetrina ou outro sal, poli-L-lisina, polialilamina, polietileneimina, entre outros, e/ou mistura destes. A adição destes pode ser realizada após a formação das nanoestruturas lipídicas ou dos complexos com os ácidos nucleicos.

**[0072]** Em uma concretização, a fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção dos lipossomas compreendem:

fase lipídica:

- DOPE (0,5% p/p a 5,0% p/p);

- DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p);
- DSPE-PEG (0,25% p/p a 5,0% p/p);

fase aquosa:

- Glicerol (0,1% p/p a 5,0% p/p);
- Ácidos nucleicos para a proporção entre +2/-1 e +8/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO);
- Solução de quitosana (0,001mg/mL a 10mg/mL).

**[0073]** Em uma concretização, a fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção das nanoemulsões compreendem:

fase lipídica:

- DOPE (0,5% p/p a 5,0% p/p);
- DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p);
- DSPE-PEG (0,25% p/p a 5,0% p/p);
- Triglicerídeos de cadeia média (2,0% p/p a 20,0% p/p);

fase aquosa:

- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p);
- ácidos nucleicos para a proporção entre +2/-1 e +8/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO);
- solução de quitosana (0,001mg/mL a 10mg/mL).

**[0074]** Em uma concretização, a fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção das nanopartículas lipídicas sólidas compreendem:

fase lipídica:

- monoestearato de glicerila (2,0% p/p a 10,0% p/p);
- DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p);

fase aquosa:

- 1,0% p/p Polissorbato 80 (1,0% p/p a 5,0% p/p);
- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p);
- Ácidos nucleicos para a proporção entre +2/-1 e +8/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO);
- Solução de quitosana (0,001mg/mL a 10mg/mL).

**[0075]** Em uma concretização, a fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados compreendem:

fase lipídica:

- Mistura na proporção 7:3 de monoestearato de glicerila e triglicerídeos de cadeia média (2,0% p/p a 10,0% p/p);
- DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p);

fase aquosa:

- Polissorbato 80 (1,0% p/p a 5,0% p/p);
- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p);
- Ácidos nucleicos para a proporção entre +2/-1 e +8/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO);
- Solução de quitosana (0,001mg/mL a 10mg/mL).

**[0076]** Em uma concretização, uma solução de polications não-lipídicos poderá ser adicionada após a formação das nanoestruturas.

**[0077]** Em uma concretização, as composições poderão ser incorporadas em forma de solução, suspensão, gel, pó, entre outras.

**[0078]** Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso da composição para terapia gênica do sistema nervoso central no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por deficiências ou anomalias genéticas.

**[0079]** Em uma concretização, o uso da composição para terapia gênica do sistema nervoso central é no preparo de um medicamento para o tratamento das doenças lisossômicas de depósito que possuam acometimento neurológico.

**[0080]** Em uma concretização ideal, o uso da composição para terapia gênica do sistema nervoso central é através da administração nasal.

**[0081]** A presente invenção apresenta como vantagens uma maior penetrabilidade intracelular devido ao uso de sistemas nanométricos no carregamento e administração de ácidos nucleicos possibilitando a produção de uma proteína deficiente, através do uso de nucleases combinado a ácidos

nucleicos guia e ácidos nucleicos contendo a sequência parcial ou inteira de um gene, ou ainda de um plasmídeo recombinante contendo a sequência inteira de um gene. Também é uma vantagem a possibilidade de tratamento de doenças que possam ser causadas por problemas genômicos utilizando os produtos da presente invenção.

### **Exemplos - Concretizações**

**[0082]** Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar o escopo da mesma.

#### **Ácidos nucleicos**

**[0083]** A composição para terapia gênica do sistema nervoso central deve conter ao menos um ácido nucleico, seja ele uma sequência de RNA guia, um plasmídeo ou oligonucleotídeo contendo a sequência codificadora para a proteína Cas ou outra nuclease, uma sequência de DNA doadora para recombinação homóloga ou ainda uma sequência inteira de um gene que pode ou não estar contida em um plasmídeo recombinante. A nuclease proteica também pode fazer parte da composição para terapia gênica do sistema nervoso central.

**[0084]** Nas composições da presente invenção, o ácido nucleico pode ser tanto um ácido desoxirribonucleico, como um ácido ribonucleico. Pode tratar-se de sequências de origem natural ou artificial.

**[0085]** Com relação mais particularmente aos ácidos desoxirribonucleicos, eles podem ser de fita simples ou dupla. Esses ácidos desoxirribonucleicos podem codificar para enzimas, RNAm ou ainda sequências parciais ou inteiras genes terapêuticos.

**[0086]** No sentido da invenção, entende-se por gene terapêutico notadamente qualquer gene codificando para um produto proteico tendo um efeito terapêutico. O produto proteico assim codificado pode ser uma proteína, um peptídeo, etc. Este produto proteico pode ser homólogo com relação à célula alvo (isto é, um produto que é normalmente expresso na célula alvo,

quando esta não apresenta nenhuma patologia). Nesse caso, a expressão de uma proteína permite por exemplo paliar uma expressão insuficiente na célula, ou a expressão de uma proteína inativa ou fracamente ativa em razão de uma modificação, ou ainda superexpressar a referida proteína. O gene terapêutico pode ainda codificar para uma proteína celular mutante, tendo uma estabilidade aumentada, uma atividade modificada, etc. O produto proteico pode igualmente ser heterólogo com relação à célula alvo. Neste caso, uma proteína expressada pode por exemplo completar ou promover uma atividade deficiente para a célula, permitindo-lhe lutar contra uma patologia, ou estimular uma resposta imune.

#### Fase lipídica

**[0087]** A fase lipídica adequada para a presente invenção é constituída por tensoativos lipofílicos, óleos, lipídeos sólidos e líquidos e/ou mistura desses.

**[0088]** Os tensoativos lipídicos incluem, mas não se limitam a, lecitina e fosfolipídios. Lecitinas são conhecidas como glicerofosfolipídios os quais são formados a partir de ácidos graxos, glicerol, ácido fosfórico e colina por esterificação. As lecitinas são frequentemente referenciadas como fosfatidilcolinas. Os fosfolipídios adequados para o uso na presente invenção incluem, mas não se limitam, a fosfolipídios encontrados na gema de ovo e na soja. São exemplos de fosfolipídios e seus derivados, fosfatidilcolina (PC), dioleilfosfatidilcolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfatidiletanolamina (PE), dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), fosfatidilserina (PS), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), fosfatidilinositol (PI), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), diestearoilfosfatidilserina (DSPS).

**[0089]** Substâncias oleosas adequadas para o uso na presente invenção incluem, mas não se limitam a, oleato de decila, isohexadecano, ésteres do

ácido esteárico e/ou oléico, etanolamida de ácido graxo de coco, óleos naturais, como o óleo de milho, amendoim, sésamo, oliva, jojoba, soja, álcool graxo, parafina, triglicerídeos de cadeia média, triglicerídeos de cadeia longa, palmitatos, miristatos e octildodecanol.

**[0090]** Lipídios sólidos adequados para o uso na presente invenção incluem, mas não se limitam a, triglicerídeos (triestearina, tricaprina, trilaurina, trimiristina, tripalmitina), ácidos graxos (ácido esteárico), álcoois graxos (álcool cetílico, álcool estearílico), ceras (mateiga de cacau, cera de carnaúba, cera de abelhas, palmitato de cetila), glicídeos parciais (monoestearato de glicerila, behenato de glicerila, palmitoestearato de glicerila, tripalmitato de glicerila, trimiristato de glicerila, triestearato de glicerila) e/ou mistura destes.

**[0091]** Os lipídios podem ser peguizados, isto é, possuindo uma ramificação de polietilenoglicol (PEG) em sua cadeia, como DSPE-PEG, DMPE-PEG, colesterol-PEG, DPPE-PEG (dipalmitoilglicerofosfoetanolamina-polietilenoglicol), DLPE-PEG (dilauroilglicerofosfoetanolamina-polietilenoglicol), entre outros.

**[0092]** Os lipídios podem ser catiônicos, como 1,2-di-orto-octadecenil-3-trimetilamôniopropano (DOTMA), 1,2-dimiristoleil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (EPC), didodecildimetilamônio (DDAB), 1, dimetildioctadecilamônio (DODAP), dioleiltrimetilamôniopropano (DOTAP), dimetilaminoetanocarbamoilcolesterol (DC-colesterol), entre outros.

**[0093]** Para se obter um efeito ótimo das composições da invenção, as proporções respectivas de ácido nucleico e de lipídio catiônico são, de preferência, determinadas de maneira que a relação cargas positivas do agente de transfecção/cargas negativas dos ácidos nucleicos seja compreendida entre 0,1 e 15 e, com maior preferência, entre 2 e 8. Essa relação de cargas pode contabilizar ou não outros lipídios carregados positivamente ou negativamente na formulação.

**[0094]** Com maior preferência, as composições da invenção compreendem, ainda, um ou vários lipídeos neutros. A requerente prevê que a

adição de um lipídio neutro permite melhorar a formação das partículas lipídicas e, de maneira surpreendente, favorecer a penetração da partícula na célula, desestabilizando sua membrana. De maneira particularmente vantajosa, utilizam-se lipídios naturais ou sintéticos, zwitteriônicos ou desprovidos de carga iônica nas condições fisiológicas. Eles podem ser escolhidos mais particularmente entre a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), a oleilpalmitoilfosfatidiletanolamina (POPE), a di-estearoil, - palmitoil, -miristoil fosfatidileta-5 nolamina, assim como seus derivados N-metilados 1 a 3 vezes; os fosfatidilglicerois, os diacilglicerois, os glicosídiacilglicerois, os cerebrosídeos (tais como notadamente os galactocerebrosídeos), os esfingolipídios (tais como notadamente as esfingomielinas), ou ainda os asialogangliosídeos (tais como notadamente os asialoGM1 e Glv12).

**[0095]** De preferência, as composições da invenção, que empregam um lipofectante a título de agente de transfecção, compreendem uma relação de 0,1 a 20 equivalentes de lipídio neutro para 0,1 a 20 equivalentes de lipídio catiônico, e, com maior preferência, a relação é respectivamente de 1 a 5 para 1 a 5, respectivamente.

**[0096]** No caso em que o agente de transfecção é um lipídio catiônico, as composições da invenção compreendem, além do lipídio catiônico nas relações citadas acima, de 0,1 a 20 equivalentes molares de lipídio neutro para 1 equivalente molar de fosfato do ácido nucleico, e, com maior preferência, de 2 a 8.

**[0097]** Em uma realização preferencial os lipossomas descritos na presente invenção compreendem o uso de DOPE (0,5% p/p a 5,0% p/p), DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p) e DSPE-PEG (0,25% p/p a 5,0% p/p).

**[0098]** Em uma realização preferencial as nanoemulsões descritas na presente invenção compreendem o uso de DOPE (0,5% p/p a 5,0% p/p), DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p), DSPE-PEG (0,25% p/p a 5,0% p/p) e triglicerídeos de cadeia média (2,0% p/p a 20,0% p/p).

**[0099]** Em uma realização preferencial as nanopartículas lipídicas

sólidas descritas na presente invenção compreendem o uso de monoestearato de glicerila (2,0% p/p a 10,0% p/p).

**[0100]** Em uma realização preferencial os carreadores lipídicos nanoestruturados descritos na presente invenção compreendem o uso de uma mistura na proporção 7:3 de monoestearato de glicerila e triglicerídeos de cadeia média (2,0% p/p a 10,0% p/p).

#### Agentes de tonicidade

**[0101]** Os agentes de tonicidade podem ser glicerol, manitol, propilenoglicol, etilenoglicol, sorbitol, etc. A concentração pode estar entre 0,1% p/p e 5,0% p/p.

#### Tensoativos hidrofílicos

**[0102]** Os tensoativos hidrofílicos adequados para o uso na presente invenção incluem os surfactantes aniônicos, não aniônicos, catiônicos e anfóteros. Preferencialmente, os surfactantes da presente invenção podem ser escolhidos de grupo que compreende, sem, contudo, limitar, surfactantes não iônicos como polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 80, monoestearato de sorbitano 20, monoestearato de sorbitano 40, monoestearato de sorbitano 60, monoestearato de sorbitano 80, emulsificantes colato de sódio, deoxicolato de sódio, glicolato de sódio, poloxâmeros, taurocolato de sódio, taureodexicolato de sódio, e/ou mistura destes.

**[0103]** Em uma realização preferencial as formulações descritas na presente invenção compreendem o uso de polissorbato 80 (1,0% p/p a 5,0% p/p).

#### Polications

**[0104]** A fase aquosa pode conter polications não-lipídicos tais como quitosana, brometo de hexadimetrina ou outro sal, poli-L-lisina, polialilamina, polietileneimina, entre outros. A adição destes pode ser realizada durante ou após a formação das nanoestruturas lipídicas.

**[0105]** Em uma realização preferencial as formulações descritas na presente invenção compreendem o uso de quitosana (0,001mg/mL p/v a

10mg/mL p/v).

#### Solventes orgânicos

**[0106]** Solventes orgânicos adequados para o uso na presente invenção incluem, mas não se limitam a, solventes orgânicos polares próticos e apróticos, como por exemplo etanol, acetona e/ou mistura desses, e solventes orgânicos apolares, como por exemplo, clorofórmio.

**[0107]** Em uma realização preferencial os lipossomas e as nanoemulsões da presente invenção compreendem o uso de clorofórmio para a solubilização dos componentes da fase lipídica e uma mistura de clorofórmio: metanol: água (1:2,1:1).

#### Obtenção das nanoestruturas lipídicas

**[0108]** Os processos de obtenção das nanoemulsões compreendem as etapas de:

a) dissolver de 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica em uma solução orgânica composta por um solvente orgânico apolar;

b) dissolver de 0,1% p/p a 5,0% p/p de agente de tonicidade em uma solução aquosa;

c) evaporar todo o solvente orgânico do produto obtido na etapa a, obtendo assim um filme lipídico;

d) adicionar a solução aquosa ao filme lipídico e deixar por 4 a 72 horas em 2°C a 20°C;

e) sonicar a formulação por 1 a 60 minutos a uma temperatura entre 25°C e 50°C;

f) homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada;

g) adicionar polications não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

**[0109]** Os processos de obtenção dos lipossomas compreendem as etapas de:

a) dissolver de 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica em uma solução orgânica composta por um solvente orgânico apolar;

b) dissolver de 0,1% p/p a 5,0% p/p de agente de tonicidade em uma solução aquosa;

c) evaporar todo o solvente orgânico do produto obtido na etapa a;

d) adicionar a solução aquosa ao filme lipídico e deixar por 4 a 72 horas em 2°C a 20°C;

e) sonicar a formulação por 1 a 60 minutos a uma temperatura entre 25°C e 50°C;

f) homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada;

g) extrusar a formulação em ao menos uma membrana com poro de 1000 nm a 220 nm e em ao menos uma membrana de 220 nm a 50 nm.

g) adicionar policações não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

**[0110]** É um objeto adicional da presente invenção os processos de obtenção das nanoemulsões que terão os ácidos nucleicos encapsulados, com as etapas de:

a) dissolver de 0,1% p/p a 5,0% p/p de lipídeo catiônico juntamente com os ácidos nucleicos em uma mistura monofásica de solventes apolar: prótico: prótico (1:2,1:1) por 30 minutos;

b) separar a monofase num sistema de duas fases pela adição de um solve apolar e um prótico (2 mL cada), seguido por vórtex breve. As fases polar e apolar são separadas por centrifugação a uma pressão entre 1000 e 4000 x g durante 2 a 30 min em temperatura entre 15°C e 35°C;

c) adicionar de 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica à fase orgânica do pré-complexo;

d) dissolver de 0,1% p/p a 5,0% p/p de agente de tonicidade em uma solução aquosa;

e) evaporar o solvente orgânico para formar um filme;

f) adicionar a fase aquosa;

g) deixar por 4 a 72 horas em 2°C a 20°C;

e) sonicar por 1 a 60 minutos a uma temperatura entre 25°C e 50°C;

f) homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada;

g) adicionar polications não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

**[0111]** O processo de obtenção das nanoestruturas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os ácidos nucleicos adsorvidos, compreende as etapas de:

a) fundir de 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica a uma temperatura entre 30° C a 80° C;

b) dissolver de 1,0% p/p a 5,0% p/p de tensoativo e de 0,1% p/p a 5,0% p/p de agente de tonicidade em uma solução aquosa, com temperatura de 30°C a 80°C;

c) adicionar a solução aquosa na solução oleosa, sob agitação e com temperatura de 30° C a 80° C;

d) agitar no dispersor ultra-turrax, a uma velocidade entre 500 e 25000 rpm sob aquecimento de 30° C a 80° C, durante período compreendido de 30 segundos a 5 minutos;

e) homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada.

f) adicionar polications não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

#### Formulações compreendendo os carreadores lipídicos

**[0112]** Os produtos da presente invenção são formulações que compreendem as nanoestruturas lipídicas, associadas a excipientes adequados, úteis nas áreas farmacêutica e médica.

**[0113]** Os carreadores da presente invenção podem estar sob a forma de nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.

**[0114]** Em uma concretização, as composições poderão ser incorporadas em forma de solução, suspensão, gel, pó, entre outras.

#### Especificação das nanopartículas lipídicas

**[0115]** A formação de nanopartículas foi primeiramente confirmada pela

evidência de caráter homogêneo (sem separação de fases) e pela não ocorrência de precipitados. A seguir, as formulações foram especificadas de acordo com o diâmetro médio de gotícula/vesícula, índice de polidispersão, potencial zeta, e capacidade de complexação com os ácidos nucleicos.

**[0116]** Determinação do diâmetro de gotícula/partícula e do índice de polidispersão (IPD):

**[0117]** As formulações foram especificadas através do espalhamento de luz dinâmico pela difusão de raio laser monocromático que atravessa a dispersão coloidal. Essa determinação foi realizada observando-se o espalhamento a 173° C após diluição das amostras em água purificada, previamente filtrada em membrana de 0,22 µm. Os resultados foram expressos como média de três determinações independentes.

#### Determinação do potencial zeta

**[0118]** O potencial zeta foi determinado através da mobilidade eletroforética das gotículas/vesículas. As medidas foram realizadas após calibração com uma solução padrão a -55 mV (látex poliestireno carboxilato). Todas as análises foram realizadas após a diluição das amostras em água purificada, previamente filtrada em membrana nylon de 0,22 µm. Os resultados foram expressos como média de três determinações independentes.

#### Taxa de complexação com os ácidos nucleicos

**[0119]** A complexação dos ácidos nucleicos com as formulações foi verificada através de eletroforese em gel de agarose. Os complexos foram avaliados na relação de cargas +4/ -1 (cargas do lipídio catiônico/cargas dos ácidos nucleicos) e foram sujeitos à eletroforese em gel de agarose 1 % corados com o corante SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A estabilidade dos complexos das nanoestruturas catiônicas/DNA foi determinada utilizando um ensaio de digestão com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, EUA). As bandas foram analisadas e sua intensidade foi calculada através do software ImageJ<sup>®</sup>, gerando a taxa de complexação em porcentagem.

**Exemplo 1: Nanocarreador lipídico consistindo de uma nanoemulsão com complexação do ácido nucleico por adsorção.**

**Composição final:**

**[0120]** Fase lipídica

- a. 5% p/p Triglicerídeos de cadeia média
- b. 0,56% p/p DOPE
- c. 0,56% p/p DOTAP
- d. 0,285% p/p DSPE-PEG

**[0121]** Fase aquosa

- e. 2,25% p/p Glicerol
- f. ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).
- g. 0,001mg/mL p/v quitosana.

**Procedimento:**

**[0122]** Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados e dissolvidos em clorofórmio, com agitação constante. Os componentes da fase aquosa foram pesados e dissolvidos em água purificada, com agitação constante. A fase orgânica foi rota evaporada a pressão normal e temperatura ambiente, para eliminação do solvente orgânico e até a secura total, para formação do filme lipídico. Ao final do processo, a fase aquosa foi vertida sobre o filme lipídico, que foi mantido a 4°C durante 12 horas. Após, a formulação foi sonicada a 37°C durante 15 minutos. Após, então, a formulação foi homogeneizada em homogeneizador a alta pressão por 10 ciclos de 500 bar cada, a fim de manter o diâmetro de gotícula da fase oleosa o menor possível e com menor índice de polidispersão. Por fim, os ácidos nucleicos foram adicionados à formulação e após, a solução de quitosana.

**Produto obtido:** Nanoemulsão (NA).

**Resultados:**

- Tamanho: 163 nm
- IPD: 0,14

- Potencial zeta: +47,1 mV
- Taxa de complexação: 100%. Ver figura 1.

**Exemplo 2:** Nanocarreador lipídico consistindo de uma nanoemulsão com complexação do ácido nucleico por encapsulamento.

Composição:

**[0123]** Fase lipídica

- h. 5% p/p Triglicerídeos de cadeia média
- i. 0,56% p/p DOPE
- j. 0,56% p/p DOTAP
- k. 0,285% p/p DSPE-PEG

**[0124]** Fase aquosa

- l. 2,25% p/p Glicerol
- m. ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO)
- n. 0,001mg/mL p/v quitosana.

Procedimento:

**[0125]** Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados. O complexo hidrofóbico DNA/DOTAP foi preparado através da incubação dos ácidos nucleicos com o lipídio catiônico DOTAP numa mistura monofásica de clorofórmio:metanol:água (1:2,1:1) em temperatura ambiente durante 30 min. A monofase foi, então, dividida em duas fases pela adição de clorofórmio e água (2 mL de cada), seguido por vórtex breve. As fases aquosa superior e orgânica inferior foram separadas por centrifugação a 2000 x g durante 10 min em temperatura ambiente. Na fase orgânica, então, os demais lipídios foram dissolvidos. Os componentes da fase aquosa foram pesados e dissolvidos em água purificada, sob agitação constante. A fase orgânica foi rota evaporada a pressão normal em temperatura ambiente, para eliminação do solvente orgânico e até a secura total, para formação do filme lipídico. Ao final do processo, a fase aquosa foi vertida sobre o filme lipídico, que é mantido a 4°C durante 12 horas. Após, a formulação foi sonicada a 37°C durante 15 minutos.

Após, então, a formulação foi homogeneizada em homogeneizador a alta pressão por 10 ciclos de 500 bar cada, a fim de manter o diâmetro de gotícula da fase oleosa o menor possível e com menor índice de polidispersão. Por fim a solução de quitosana foi adicionada à formulação.

Produto obtido: Nanoemulsão (NE).

Resultados:

-Tamanho: 163 nm

-IPD: 0,14

-Potencial zeta: +48,7 mV

-Taxa de complexação: 100%. Ver figura 1.

**Exemplo 3:** Nanocarreador lipídico consistindo de um lipossoma com complexação do ácido nucleico por adsorção.

Composição:

**[0126]** Fase lipídica

o. 0,56% p/p DOPE

p. 0,56% p/p DOTAP

q. 0,285% p/p DSPE-PEG

**[0127]** Fase aquosa

r. 2,25% p/p Glicerol

s. ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO)

t. 0,001mg/mL p/v quitosana.

Procedimento:

**[0128]** Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados e dissolvidos em clorofórmio, com agitação constante. Os componentes da fase aquosa foram pesados e dissolvidos em água purificada, com agitação constante. A fase orgânica foi rota evaporada a pressão normal e temperatura ambiente, para eliminação do solvente orgânico e até a secura total, para formação do filme lipídico. Ao final do processo, a fase aquosa é vertida sobre o filme lipídico, que é mantido a 4°C durante 12 horas. Após, a formulação é

sonicada a 37°C durante 15 minutos. Após, então, a formulação é homogeneizada em homogeneizador a alta pressão por 10 ciclos de 500 bar cada, a fim de manter o diâmetro de gotícula da fase oleosa o menor possível e com menor índice de polidispersão. Por fim, os ácidos nucleicos foram adicionados à formulação e, após, a quitosana.

Produto obtido: Lipossoma (LA).

Resultados:

-Tamanho: 108 nm

-IPD: 0,17

-Potencial zeta: +38,7 mV

-Taxa de complexação: 100%. Ver figura 1.

**Exemplo 4:** Nanocarreador lipídico consistindo de uma nanopartícula lipídica sólida com complexação do ácido nucleico por adsorção.

Composição:

**[0129]** Fase orgânica

u. 1,4% p/p Monoestearato de glicerila

v. 0,6% p/p DOTAP

**[0130]** Fase aquosa

w. 1,0% p/p Polissorbato 80

x. 2,25% p/p Glicerol

y. ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO)

z. 0,005mg/mL p/v quitosana.

Procedimento:

**[0131]** Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados e fundidos a uma temperatura de 80° C, sob agitação constante. Os componentes da fase aquosa foram pesados e dissolvidos em um volume final de 100 mL de água purificada, sob agitação constante a uma temperatura de 80° C. A fase aquosa foi vertida sobre a fase lipídica, mantendo-se a temperatura em 80° C e com agitação constante durante 15 minutos. A

formulação foi misturada em ultra-turrax durante 1 minuto, a uma velocidade de 13.500 rpm e temperatura de 80° C. Ao final do processo, a formulação foi então homogeneizada a quente em homogeneizador a alta pressão com 10 ciclos de 750 bar cada, a fim de manter o diâmetro de partícula da fase oleosa o menor possível e com menor índice de polidispersão. O produto foi deixado em repouso em temperatura ambiente por no mínimo 10 minutos. Por fim a solução de quitosana foi adicionada.

Produto obtido: Nanopartícula lipídica sólida.

Resultados:

- Tamanho: 388 nm
- IPD: 0,69
- Potencial zeta: +2,20 mV
- Taxa de complexação: 100%.

**Exemplo 5:** Nanocarreador lipídico consistindo de um carreador lipídico nanoestruturado.

Composição:

**[0132]** Fase orgânica

- aa.1,0% p/p Monoestearato de glicerila
- bb.0,5% p/p DOTAP
- cc.0,5% p/p Triglicerídeos de cadeia média

**[0133]** Fase aquosa

- dd.1,0% p/p Polissorbato 80
- ee.2,25% p/p Glicerol
- ff. ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO)
- gg.0,05mg/mL p/v quitosana.

Procedimento:

**[0134]** Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados e fundidos a uma temperatura de 80° C, sob agitação constante. Os componentes da fase aquosa foram pesados e dissolvidos para um volume

final de 100 mL de água purificada, com agitação constante a uma temperatura de 80° C. A fase aquosa foi vertida sobre a fase lipídica, mantendo-se a temperatura a 80° C e com agitação constante durante 15 minutos. A formulação foi misturada em ultra-turrax durante 1 minuto, a uma velocidade de 13.500 rpm e temperatura de 80° C. Ao final do processo, a formulação foi então homogeneizada a quente em homogeneizador a alta pressão com 10 ciclos de 750 bar cada, a fim de manter os diâmetros de partícula da fase oleosa o menor possível e com menor índice de polidispersão. O produto foi deixado em repouso a uma temperatura ambiente por no mínimo 10 minutos. Por fim a quitosana foi adicionada.

Produto obtido: Carreador lipídico nanoestruturado.

Resultados:

- Tamanho: 238 nm
- IPD: 0,48
- Potencial zeta: +3,12 mV
- Taxa de complexação: 100%.

Administração nasal

**[0135]** Para a entrega dos carreadores lipídicos contendo ao menos um ácido nucleico para fins de terapia gênica do sistema nervoso central, a invenção proporciona a administração nasal *in vivo*. Esta administração pode se dar com gotas nasais, por spray intranasal ou intratraqueal para entrega pulmonar e/ou cerebral, por via inalatória, e/ou por meio de outros veículos aerossóis.

**[0136]** Para a entrega dos carreadores lipídicos contendo ao menos um ácido nucleico para fins de terapia gênica do sistema nervoso central, a invenção prioriza o uso da via nasal. Muitos fármacos potenciais para o tratamento de doenças neurológicas são incapazes de atingir o cérebro em concentrações suficientes para serem terapêuticas devido à barreira hematoencefálica. Por outro lado, a administração direta de fármacos ao cérebro proporciona a possibilidade de uma maior efetividade terapêutica do

que com a administração sistêmica de um fármaco, exatamente por contornar a barreira hematoencefálica e por proporcionar o transporte de moléculas de alto peso molecular. A utilização da administração nasal de agentes terapêuticos ao cérebro proporciona um meio de contornar a barreira hematoencefálica de uma forma não invasiva. Nesse contexto, mostrou-se que os transportadores de fármaco nanométricos melhoram a administração de fármacos ao sistema nervoso central em comparação com soluções de fármaco equivalentes. As condições neurológicas que poderiam se beneficiar da administração nasal para entrega no cérebro incluem dor, epilepsia, doenças neurodegenerativas e doenças infecciosas (WY, O. et al, Nose-to-brain drug delivery by nanoparticles in the treatment of neurological disorders, *Curr Med Chem*, 2014, 21(37), p. 4247-56).

Exemplos de aplicação do produto obtido de acordo com o exemplo 3, acima descrito:

Ensaio *in vivo* em modelo murino de MPS I

**[0137]** Foi utilizado como modelo animal camundongo nocaute para o gene da *Idua* (murina). Este modelo foi criado por meio da interrupção do éxon 6 do gene da *Idua*. No meio do éxon foi inserido um gene de resistência à neomicina em sentido inverso. Como resultado foram produzidos camundongos com uma doença que mimetiza a Síndrome de Hurler, fenótipo mais grave da MPS I, com aumento do nível de glicosaminoglicanos na urina e em diversos tecidos, e atividade indetectável de *Idua*.

**[0138]** Todos os procedimentos com animais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e seguem as normas de adequação às diretrizes vigentes previstas na Lei 11.794/08 e nas resoluções normativas números 12 (Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos) e 30 (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA). Os animais são mantidos em ambiente controlado (temperatura 20-24°C, umidade relativa do ar 40-60% e sistemas de exaustão de ar) com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de

escuro e alimentação comercial padrão para a espécie e água ad libitum. Todos os animais utilizados foram genotipados por identificação molecular do transgene.

#### Construção dos plasmídeos CRISPR/Cas9 ROSA26 e Doador *Idua* ROSA26

**[0139]** Um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para os experimentos de edição genômica. Neste sistema, a nuclease Cas9 e o RNA guia formado por um transcrito crRNA-tracrRNA estão presentes em um único vetor, o sgRNA (single guide RNA). Uma sequência alvo para clivagem pela Cas9 foi selecionada no locus ROSA26 do genoma de camundongos e foi inserida no vetor. O vetor completo foi inserido por transformação por choque térmico em bactérias competentes TOP 10 (Invitrogen, USA), cujas colônias foram então expandidas e submetidas à extração de plasmídeo com o kit Maxiprep (Life Technologies, EUA). O DNA plasmídeo extraído foi então sequenciado para verificação da correta orientação do inserto.

**[0140]** Para a recombinação direcionada é utilizado um vetor contendo o cDNA da *Idua*. O construto contém a sequência de cDNA da *Idua* regulada por um promotor e duas regiões homólogas (de aproximadamente 1 kb cada uma) ao locus ROSA26 de camundongos, na região do locus em que a Cas9 reconhece e cliva.

**[0141]** Já para os experimentos de terapia gênica do sistema nervoso central com plasmídeo recombinante, foi utilizado um plasmídeo (pIDUA) contendo o cDNA da *IDUA* construído usando o vetor de expressão comercial pREP9 (Invitrogen, USA) como descrito por Camassola e colaboradores (M. Camassola, L.M. Braga, A. Delgado-Cañedo, T.P. Dalberto, U. Matte, M. Burin, R. Giugliani, N.B. Nardi, Nonviral in vivo gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model, J. Inherit. Metab. Dis. 28 (2005) 1035–1043).

#### Tratamentos

**[0142]** Um grupo (n=5) foi utilizado para a administração dos complexos lipossomais contendo o plasmídeo CRISPR/Cas9 e o plasmídeo *Idua/Rosa26*

(LA) e este recebeu por via nasal o complexo LA em 30 aplicações de 120µL. Como controles foram utilizados camundongos normais que não receberam nenhum tratamento (n=3) e camundongos MPS I que não receberam nenhum tratamento (n=3). Para a administração nasal, os animais são imobilizados pelo pesquisador e são instiladas seis doses de 10µL em cada narina, a cada 15 minutos, uma vez por dia, durante 30 dias.

**[0143]** Outro tratamento foi concretizado utilizando-se um grupo (n=5) para a administração dos complexos de nanoemulsões contendo o plasmídeo pIDUA (NA/pIDUA) e este recebeu por via nasal o complexo em 2 aplicações de 120µL. Como controles foram utilizados camundongos normais que não receberam nenhum tratamento (n=3) e camundongos MPS I que não receberam nenhum tratamento (n=3). Para a administração nasal, os animais são imobilizados pelo pesquisador e são instiladas seis doses de 10µL em cada narina, a cada 15 minutos, duas vezes em um dia.

#### Dosagem enzimática sérica de *Idua*

**[0144]** O nível sérico e tecidual de *Idua* foi mensurado nos animais tratados com LA a partir de 15 dias após o tratamento, e após, 30 dias. Os resultados foram comparados com animais MPS I não-tratados e animais normais. A atividade enzimática foi avaliada através do ensaio enzimático por método fluorimétrico utilizando o substrato artificial 4-metil-umbeliferil-alfa-L-iduronídeo. A unidade a ser adotada foi nmol/h/mL de soro ou nmol/h/mg de proteína (medida através do método de Lowry). Para isto, o soro foi incubado com o substrato fluorescente 4-metilumbeliferil α-L-iduronídeo a 37 °C por 1 h em tampão formato de sódio (pH 2,8). A fluorescência foi medida em 365 nm (excitação) e 450 nm (emissão) utilizando o fluorímetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, CA, USA). Neste ensaio, a quantidade de IDUA foi medida pela quantidade de substrato clivado em 1 hora. Ver Figuras 2 e 3.

**[0145]** A figura 5 mostra os valores de atividade enzimática de IDUA encontrada em diferentes órgãos e mais precisamente no cérebro de camundongos MPS I não tratados e em camundongos MPS I tratados com o

complexo NA/pIDUA por via nasal em uma aplicação. Valores relativos à atividade enzimática de camundongos normais.

Equivalentes

**[0146]** Diversas modificações do invento e muitas outras concretizações do mesmo, em adição aos representados e descritos aqui, tornar-se-ão evidentes para os especialistas na técnica do conteúdo integral deste documento, incluindo referências à literatura científica e de patentes aqui referidas. O assunto presente contém informações importantes, exemplificação e orientação que pode ser adaptada à prática desta invenção nas suas várias formas de realização e equivalentes.

### **Reivindicações**

1. Composição para terapia gênica do sistema nervoso central **caracterizada** por compreender ao menos um ácido nucleico adsorvido ou encapsulado e carreadores não-virais, com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,001 a 1,0 micrômetro

2. Composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelos ácidos nucleicos serem um ou mais selecionados do grupo que consiste em: sequência de RNA guia, sequência codificadora de nuclease, sequência de DNA modelo para recombinação homóloga, sequência inteira de um gene ou plasmídeo recombinante contendo a sequência inteira de um gene

3. Composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 e 2, **caracterizada** pelas nanoestruturas serem nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados

4. Composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada** por compreender excipientes farmacologicamente adequados

5. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pela obtenção da composição para terapia gênica do sistema nervoso central compreender as etapas de:

(a) dissolver entre 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica em uma solução orgânica;

(b) dissolver entre 0,1% p/p a 5,0% p/p de agente de tonicidade em uma solução aquosa;

(c) evaporar a solução orgânica obtida na etapa (a), para formar um filme;

(d) adicionar a solução aquosa obtida na etapa (b) ao filme lipídico obtido na etapa (c);

(e) deixar descansar o produto obtido na etapa (d) por 4 a 72 horas em uma temperatura entre 2°C e 20°C;

(f) sonicar a formulação obtida na etapa (e) por 1 a 60 minutos a uma temperatura entre 25°C e 50°C;

(g) homogeneizar a formulação obtida na etapa (f) em um homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada; e

h) adicionar polímeros não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v)

6. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central de acordo com a reivindicação 7, caso o produto a ser obtido seja o lipossoma, **caracterizado** por compreender a etapa adicional:

(i) extrusar a formulação obtida na etapa (g) em ao menos uma membrana com tamanho de poro de 1000 nm a 220 nm e em ao menos uma membrana com tamanho de poro de 220 nm a 50 nm

7. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pela solução orgânica ser um solvente orgânico escolhido do grupo que compreende solventes orgânicos polares próticos, apróticos ou apolares e/ou mistura dos mesmos

8. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que, para a obtenção de nanoemulsões contendo os ácidos nucleicos encapsulados, a solução orgânica descrita na etapa (a) é a fase orgânica do pré-complexo obtido através das etapas:

(i) dissolver de 0,1% p/p a 5,0% p/p de lipídeo catiônico e ácidos nucleicos em uma mistura monofásica de solventes apolar: prótico:prótico (1:2,1:1) por 30 minutos;

(ii) adicionar ao produto obtido na etapa (i) 2 mL de solvente apolar e 2 mL de solvente prótico;

(iii) agitar o produto obtido na etapa (ii) brevemente em vórtex;

(iv) centrifugar o produto obtido na etapa (iii) a uma pressão entre 1000 e 4000 x g durante 2 a 30 min em uma temperatura entre 15 a 35°C; e

(v) separar a fase orgânica obtida na etapa (iv)

9. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** por, caso o produto a ser obtido seja nanoestruturas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os ácidos nucleicos adsorvidos, compreender as etapas de:

(A) fundir de 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica a uma temperatura entre 30° C e 80° C;

(B) dissolver, de 1,0% p/p a 5% p/p de tensoativo e de 0,1% p/p a 5,0% p/p de um agente de tonicidade em uma solução aquosa, com temperatura de 30° C a 80° C;

(C) adicionar a solução aquosa da etapa (A) na solução oleosa da etapa (B), sob agitação e com temperatura de 30° C a 80° C;

(D) agitar o produto obtido em (C) em dispersor ultra-turrax, a uma velocidade entre 500 e 25000 rpm, sob aquecimento de 30° C a 80° C, durante 30 segundos a 5 minutos;

(E) homogeneizar a formulação obtida em (D) em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada; e

(F) adicionar polications não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

10. Processo de obtenção de composição editora de genoma, de acordo com as reivindicações 5 a 9, **caracterizado** pela formulação ser submetida à etapa posterior de evaporação da água sob pressão normal ou reduzida entre 0 e 1000 mbar a uma temperatura entre 10°C e 50°C

11. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo solvente orgânico polar prótico ser metanol, e o solvente orgânico apolar ser clorofórmio

12. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com as reivindicações 5 a 9 **caracterizado pela fase**

lipídica ser escolhida do grupo que consiste em:

a) lipídeos líquidos tais como oleato de decila, isohexadecano, ésteres do ácido esteárico e/ou oléico, etanolamida de ácido graxo de coco, óleos naturais, como o óleo de milho, amendoim, sésamo, oliva, jojoba, soja, álcool graxo, parafina, triglicerídeos de cadeia média, triglicerídeos de cadeia longa, palmitatos, miristatos e octildodecanol;

b) lipídeos sólidos tais como triestearina, tricaprina, trilaurina, trimiristina, tripalmitina, ácido esteárico, álcool cetílico, álcool estearílico, mateiga de cacau, cera de carnaúba, cera de abelhas, palmitato de cetila, monoestearato de glicerila, behenato de glicerila, palmitoestearato de glicerila, tripalmitato de glicerila, trimiristato de glicerila, triestearato de glicerila e/ou mistura destes;

c) tensoativos lipofílicos tais como lecitinas e fosfolipídeos e/ou mistura dos mesmos;

d) lipídeos neutros;

e) lipídeos catiônicos; e

f) lipídios com ramificação de PEG (peguilados).

13. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com as reivindicações 5 a 9, **caracterizado** pelo agente de tonicidade ser escolhido do grupo que compreende sorbitol, etilenoglicol, polietilenoglicol, manitol, glicerol, e/ou mistura destes

14. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 13, **caracterizado** pela fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção dos lipossomas compreenderem:

fase lipídica:

- DOPE (0,5% p/p a 5,0% p/p);
- DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p);
- DSPE-PEG (0,25% p/p a 5,0% p/p);

fase aquosa:

- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p);

- Ácidos nucleicos para a proporção entre +2/-1 e +8/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO);

- Solução de polications não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v)

15. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 13, **caracterizado** pela fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção das nanoemulsões compreenderem:

fase lipídica:

- DOPE (0,5% p/p a 5,0% p/p);

- DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p);

- DSPE-PEG (0,25% p/p a 5,0% p/p);

- Triglicerídeos de cadeia média (2,0% p/p a 20,0% p/p);

fase aquosa:

- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p)

- Ácidos nucleicos para a proporção entre +2/-1 e +8/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO);

- Solução de polications não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v)

16. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 13, **caracterizado** pela fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção das nanopartículas lipídicas sólidas compreenderem:

fase lipídica:

- monoestearato de glicerila (2,0% p/p a 10,0% p/p);

- DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p);

fase aquosa:

- 1,0% p/p Polissorbato 80 (1,0% p/p a 5,0% p/p);

- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p); e

- Ácidos nucleicos para a proporção entre +2/-1 e +8/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO);

- Solução de polications não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v)

17. Processo de obtenção de composição editora de genoma, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 13, **caracterizado** pela fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados compreenderem:

fase lipídica:

- Mistura na proporção 7:3 de monoestearato de glicerila e triglicerídeos de cadeia média (2,0% p/p a 10,0% p/p);

- DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p);

fase aquosa:

- 1,0% p/p Polissorbato 80 (1,0% p/p a 5,0% p/p);

- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p); e

- Ácidos nucleicos para a proporção entre +2/-1 e +8/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO);

- Solução de polications não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v)

18. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 13, **caracterizado** pela adição de uma solução de polications não-lipídicos na concentração de 0,001mg/mL (p/v) a 10mg/mL (p/v), que compreende a quitosana, brometo de hexadimetrina ou outro sal, poli-L-lisina, polialilamina, polietileneimina, entre outros, e/ou mistura destes. A adição destes pode ser realizada antes ou após a formação das nanoestruturas lipídicas ou dos complexos com os ácidos nucleicos

19. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 18, **caracterizado** pela incorporação das composições em forma de solução, suspensão, gel, pó, entre outras formas farmacêuticas

20. Uso da composição para terapia gênica do sistema nervoso central conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** por ser no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por deficiências ou anomalias genéticas que possuam acometimento neurológico

21. Uso da composição para terapia gênica do sistema nervoso central de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** por ser no preparo de um medicamento para o tratamento das doenças lisossômicas de depósito

22. Uso da composição para terapia gênica do sistema nervoso central de acordo com as reivindicações 20 ou 21, **caracterizada** pela administração ser nasal tendo como alvo o sistema nervoso central.

**FIGURAS**

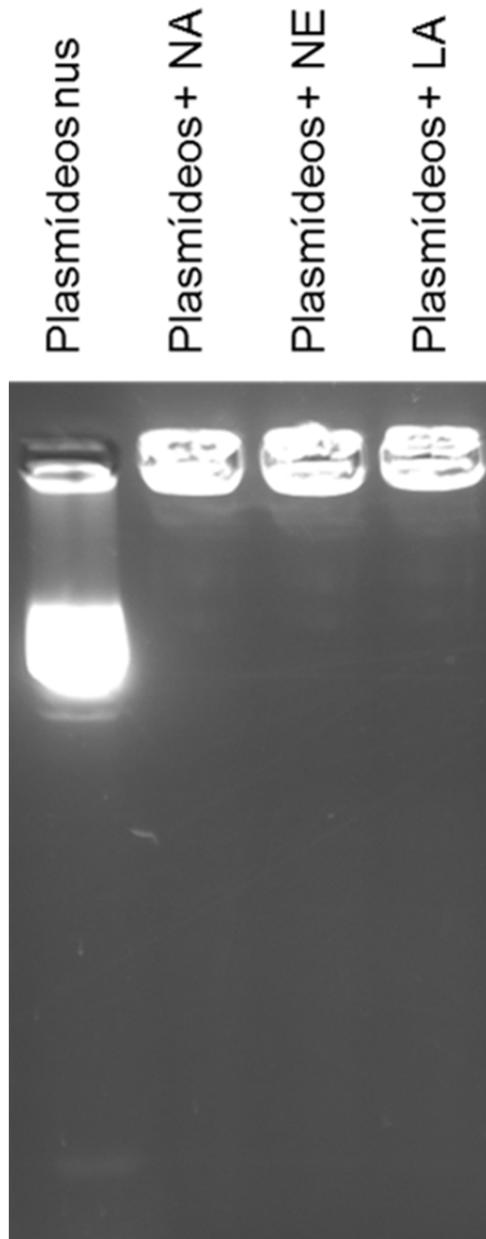


Figura 1

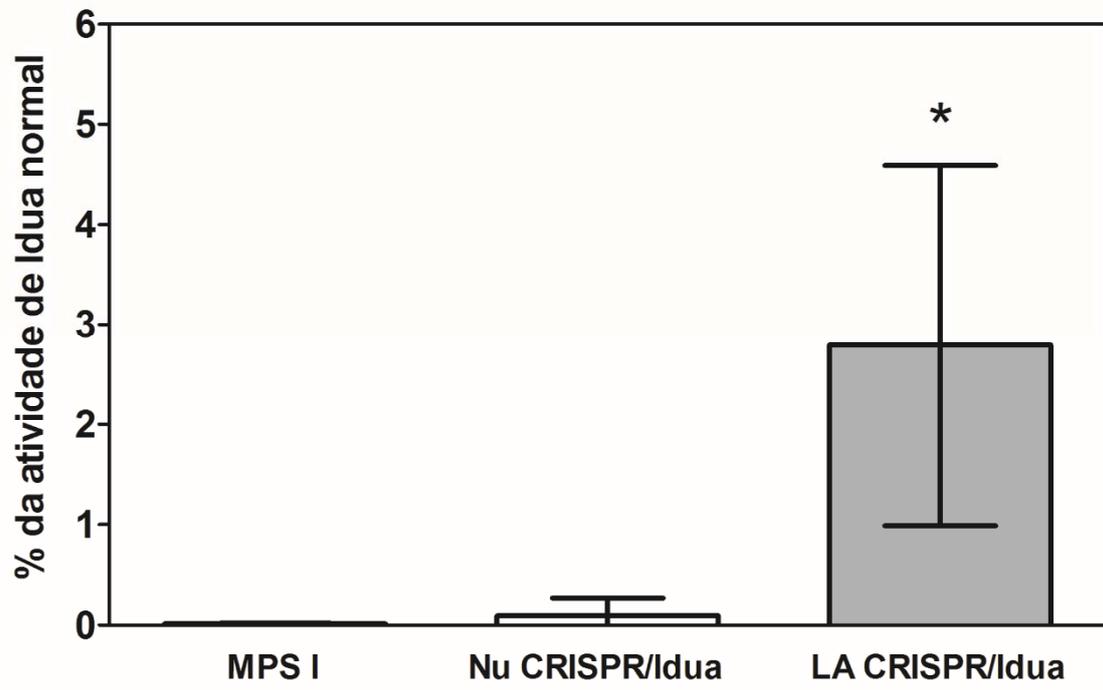


Figura 2

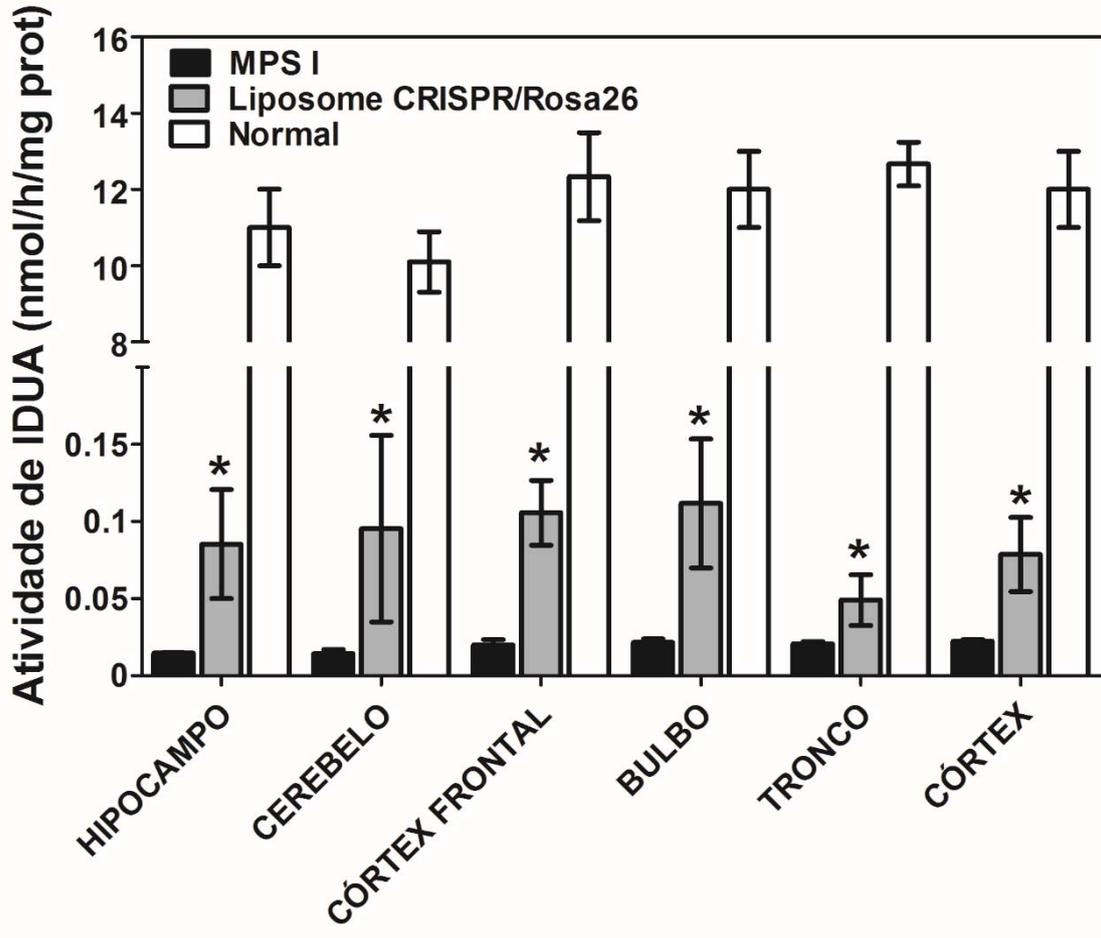


Figura 3

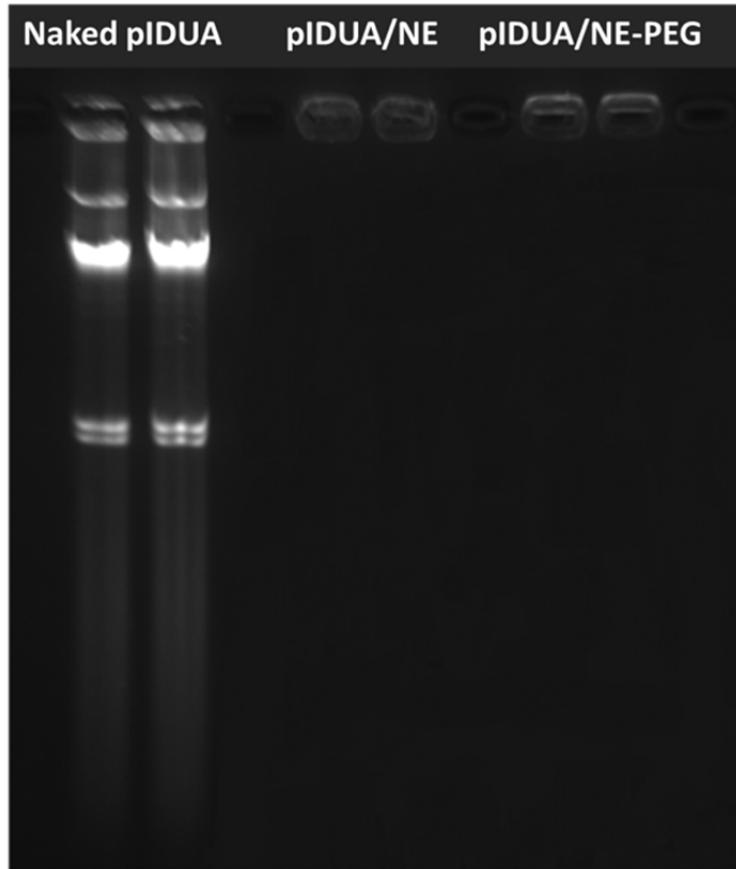


Figura 4

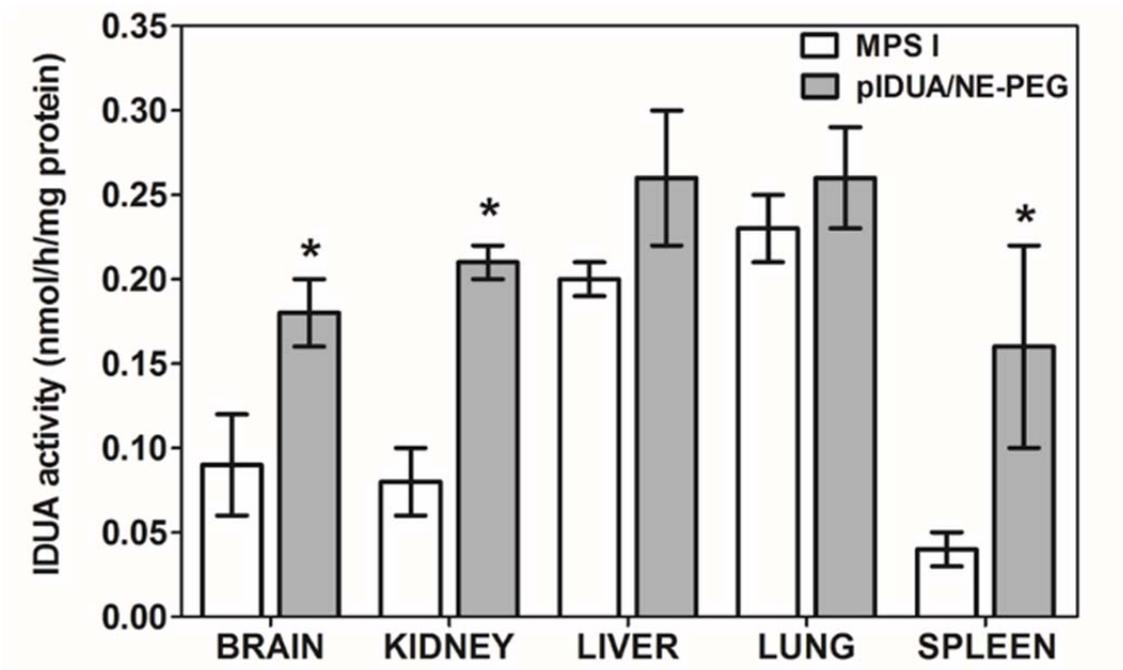


Figura 5

**Resumo****COMPOSIÇÃO PARA TERAPIA GÊNICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL,  
PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA**

A presente invenção descreve uma composição para terapia gênica do sistema nervoso central compreendendo carreadores não-virais de tamanho nanométrico ( $< 1,0$  micrômetro) complexados com ao menos um ácido nucleico para fins de terapia gênica via administração nasal tendo como alvo principal o sistema nervoso central, e ainda os processos de obtenção de tais carreadores. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia e consiste em formulações aquosas que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica e médica.