



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

(21) BR 102018015952-6 A2



(22) Data do Depósito: 03/08/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 18/05/2021

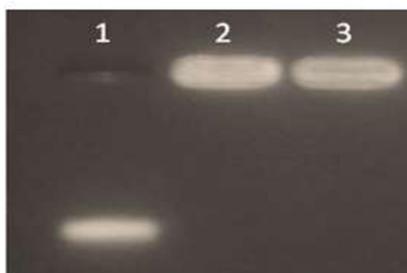
(54) **Título:** COMPOSIÇÃO OFTÁLMICA, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/7105; C10N 30/16; A61P 33/02.

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

(72) **Inventor(es):** ROSELENA SILVESTRI SCHUH; GIOVANNI KONAT ZORZI; MARILISE BRITTES ROTT; HELDER FERREIRA TEIXEIRA.

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO OFTÁLMICA, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA. A presente invenção descreve uma composição para ser utilizada por via oftálmica como terapia contra parasitas oculares, compreendendo carreadores não-virais de tamanho nanométrico ( 1,0 micrômetro) complexados com ao menos um siRNA e um agente antisséptico para fins de terapia oftálmica tendo como alvo principal a ceratite causada por *Acanthamoeba* spp, e ainda os processos de obtenção de tais carreadores. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia e consiste primariamente de formulações aquosas que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica e médica.



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

### COMPOSIÇÃO OFTÁLMICA, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA

#### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção descreve uma composição, compreendendo carreadores não-virais de tamanho nanométrico complexados a sequências de RNA de interferência para fins de terapia oftálmica tendo como alvo principal a ceratite causada por *Acanthamoeba*, e ainda os processos de obtenção de tais carreadores. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia, nas áreas farmacêutica e médica.

#### **Antecedentes da Invenção**

**[0002]** Amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* são protozoários amplamente distribuídos no ambiente e tendo sido encontrados no solo, água e ar (Marciano-Cabral F., Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev. 2003 Apr;16(2):273-307). Eles têm dois estágios diferentes de metabolismo; o trofozoíto e o cisto que são as formas vegetativa e de resistência respectivamente (Dart JK, Saw VP, Kilvington S. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. Am J Ophthalmol. 2009 Oct;148(4):487-499.e2). Algumas espécies podem ser patógenos facultativos e são conhecidos por causar infecções em humanos. Entre essas infecções, as duas principais são a quase sempre fatal Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e a Ceratite por *Acanthamoeba* (CA).

**[0003]** O diagnóstico de infecções por *Acanthamoeba* é frequentemente atrasado e o tratamento pode ser inespecífico, com duração de anos (Illingworth CD, Cook SD. *Acanthamoeba* keratitis. Surv Ophthalmol. 1998 May-Jun;42(6):493-508). A razão reside no fato de que a formação de cistos leva a recrudescência da inflamação e é, portanto, um imenso obstáculo no caminho para a recuperação dos pacientes. Infelizmente, não há tratamento

disponível que aborde especificamente a interferência no encistamento. Portanto, novas estratégias terapêuticas são requeridas.

**[0004]** Recentemente, o uso de siRNA (RNA de interferência) foi proposto para diminuir a biossíntese de proteínas-chave de formação do cisto de *Acanthamoeba* sp. (Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, et al. Therapeutic Potential of a Combination of Two Gene-Specific Small Interfering RNAs against Clinical Strains of *Acanthamoeba*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(12):5151-5155. doi:10.1128/AAC.00329-10). Sequências de siRNA inibindo a síntese da glicogênio fosforilase têm demonstrado serem particularmente promissoras, mas ainda exibem citotoxicidade importante, especialmente por causa da falta de um carreador adequado.

**[0005]** Como outros ácidos nucleicos, os siRNAs são moléculas instáveis que precisam ser protegidas da hidrólise e degradação enzimática. Vários carreadores não-virais têm sido propostos para entrega de ácidos nucleicos. Entre eles, lipossomas são um dos mais promissores, e podem superar algumas das limitações da via ocular, ao mesmo tempo em que protegem moléculas como os siRNA.

**[0006]** 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 lipídios 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 entre 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).

**[0007]** 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).

**[0008]** Além disso, a utilização de polications como a quitosana em formulações para administração é ampla, especialmente devido a suas propriedades adesivas, especialmente quando o alvo é a administração ocular, visando o aumento do tempo de residência do tratamento (Alonso MJ, Sánchez A. The potential of chitosan in ocular drug delivery. *J Pharm Pharmacol.* 2003 Nov;55(11):1451-63).

**[0009]** Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

**[0010]** A tecnologia protegida pelo número PL419081 (A1) - 12/10/2016, descreve a utilização de um agente para tratamento de infecções causadas por *Acanthamoeba*. O agente encontra-se sob a forma de uma solução num óleo vegetal ou mineral autorizado para utilização em humanos caracterizado por conter o óleo ou chá numa quantidade de 80 a 400µl de óleo de melaleuca puro por 1 ml do agente. Não há menção sobre a utilização de terapia gênica ou nanotecnologia.

**[0011]** A tecnologia JP2016183186 (A) – 10/04/2012, descreve uma composição oftálmica útil tendo um efeito significativo de desinfecção por *Acanthamoeba*, compreendendo um (A) agente de esterilização à base de biguanida e (B) cloreto de zinco. Não há menção sobre a utilização de terapia gênica ou nanotecnologia.

**[0012]** A tecnologia protegida sob o número WO2014192068 (A1) 27/05/2013, propõe uma técnica relativa a uma composição anti-*Acanthamoeba* de ação bactericida e um agente oftálmico contendo a referida composição anti-*Acanthamoeba*. A composição anti-*Acanthamoeba* contém um agente bactericida polimérico catiônico e lactoferricina como componentes ativos. Não há menção sobre a utilização de terapia gênica.

**[0013]** A tecnologia JP2014218461 (A) – 08/05/2013, descreve um agente preventivo e/ou terapêutico para ceratite causada por *Acanthamoeba* contendo

um desinfetante nitrogenado orgânico que é um desinfetante de biguanida ou um desinfetante de amônio quaternário, e um polímero contendo um dialquilamônio de dialilo com um peso molecular de 1000-150000. Não há menção sobre a utilização de terapia gênica.

**[0014]** A tecnologia protegida sob o número JP2013234176 (A) – 11/04/2013, descreve uma composição antiprotozoária útil para ceratite, especialmente ceratite por *Acanthamoeba* que é uma infecção ocular devido ao uso de lentes de contato. A composição antiprotozoária inclui caspofungina (uma espécie de equinocandina lipopeptídica macrocíclica, também denominada 1 - [(4R, 5S) -5 - [(2-aminoetil) amino] -N- (10R, 12S)-10,12-dimetil-1- oxotetradecil) -4-hidroxi-L-ornitina] -5 - [(3R) -3-hidroxi-L- ornitina] pneumocandina B) ou o seu sal, e um composto à base de biguanida ou o seu sal. Como o composto à base de biguanida, polihexanida, clorexidina e alexidina são preferencialmente citados. Entretanto, não há menção sobre a utilização de terapia gênica.

**[0015]** A tecnologia JP2011246458 (A) – 26/04/2011, refere-se, de um modo geral, a uma técnica relacionada a uma composição anti-*Acanthamoeba* tendo atividade anti-ameba (efeito de matar ameba e efeito inibitório à formação de cisto), e especialmente para fornecer um agente para prevenção e melhora da inflamação corneana de *Acanthamoeba* para a qual não há um medicamento específico. O agente (colírio, solução de cuidado para lentes de contato e similares) para prevenção e melhora da inflamação da córnea contém a composição para anti-*Acanthamoeba* tendo lactoferrina ou lactoferricina como um componente efetivo para resolver o problema. Entretanto, não há menção sobre a utilização de terapia gênica.

**[0016]** A tecnologia JP2011219445 (A) – 14/04/2010, apresenta uma composição oftálmica capaz de inibir a adesão de *Acanthamoeba castellanii* à córnea. Esta composição oftálmica pode ser preparada usando (A) glutatona e (B) um bactericida à base de biguanida simultaneamente. Entretanto, não há menção sobre a utilização de terapia gênica.

**[0017]** A tecnologia JP2005177515 (A) – 13/10/1993, refere-se a um método

que controla o crescimento de protozoários como *Acanthamoeba*, em um produto de cuidado com os olhos, como uma solução para lentes de contato. O método desta invenção inclui a adição de um agente quelante catiônico polivalente. Entretanto esse processo não utiliza componentes lipídicos em sua produção.

**[0018]** A tecnologia demonstrada no artigo de Faber e colaboradores (Faber K, Zorzi GK, Brazil NT, Rott MB, Teixeira HF. siRNA-loaded liposomes: Inhibition of encystment of *Acanthamoeba* and toxicity on the eye surface. Chem Biol Drug Des. 2017 Sep;90(3):406-416. doi: 10.1111/cbdd.12958) refere-se em parte a um método lipossomal específico para entrega de um tipo de ácido nucleico, sem envolver a utilização de co-encapsulamento com outros compostos.

**[0019]** A tecnologia protegida CA2877051 (A1) – 20/06/2012, relata um sistema de liberação de terapêuticos mucoadesivo formado por nanopartículas, entretanto não utiliza componentes lipídicos em sua composição e não visa carreamento de ácidos nucleicos.

**[0020]** A invenção WO2017142005 (A1) – 24/08/2017, descreve um solvente para lentes de contato que possui atividade anti-*Acanthamoeba*, porém não descreve a utilização de um carreador lipídico na composição.

**[0021]** A tecnologia depositada WO201298653 (A1) – 19/01/2011, relata a produção de uma preparação líquida para desinfecção de lentes de contato contendo um agente microbiano catiônico polipeptídico e hypromellose 2910, porém não relata a utilização de lipídios ou o carreamento de ácidos nucleicos.

**[0022]** As tecnologias protegidas CA2952772 (A1) – 20/06/2014; US2005118129 (A1) – 02/06/2005; US20040063591 (A1) – 30/09/2002 e WO9636371 (A1) – 21/11/1996, descrevem composições oftálmicas para tratamento de infecções oculares, porém não relatam a utilização de lipídios.

**[0023]** 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.

**[0024]** Sendo que a solução aqui proposta resolve o problema da ausência de um tratamento absolutamente efetivo e seguro no combate à ceratite causada por parasitas oculares, especificamente *Acanthamoeba* sp., e ainda trata da obtenção de carreadores eficientes de siRNA combinados a um tratamento tradicional, tornando-o mais efetivo.

### **Sumário da invenção**

**[0025]** Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir da utilização de quatro diferentes tipos de carreadores nanométricos aquosos, produzidos por métodos distintos dos mencionados no estado da técnica, contendo ao menos um siRNA tendo como alvo a *Acanthamoeba* sp. complexado na mesma formulação, contendo um agente antisséptico, para administração ocular tendo como alvo a ceratite infecciosa causada por *Acanthamoeba* spp. para fins de terapia anti-*Acanthamoeba*.

**[0026]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma composição oftálmica compreendendo ao menos um siRNA adsorvidos, preferencialmente dois siRNA e carreadores nanométricos não-virais, com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,001 a 1,0 micrômetro, pelo menos um agente antisséptico e pelo menos um polication.

**[0027]** Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição oftálmica para terapia anti-*Acanthamoeba*, onde a obtenção de carreadores, como lipossomas e nanoemulsões contendo os siRNA adsorvidos, 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) adicionar siRNA;

(i) adicionar uma solução de polications com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL; e

(j) adicionar uma solução de agente antisséptico com concentração de 0,0000001mg/mL a 10mg/mL.

**[0028]** Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição oftálmica anti-*Acanthamoeba* para obtenção de carreadores não-virais, incluindo nanoestruturas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os siRNA 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) adicionar siRNA;

(g) adicionar uma solução de polications com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL; e

(i) adicionar uma solução de agente antisséptico com concentração de 0,000001mg/mL a 10mg/mL.

**[0029]** Em um objeto quarto, a presente invenção apresenta o uso da composição no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas pela infecção de parasitas oculares. Em uma concretização ideal, o uso da composição para preparar um medicamento para o tratamento de ceratites causadas por *Acanthamoeba* spp. através da administração ocular ou intraocular.

**[0030]** A tecnologia descrita no presente invento fornece novas composições e métodos para os sintomas que acometem principalmente a região ocular. 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.

**[0031]** Em algumas realizações, as composições oftálmicas anti-*Acanthamoeba* podem ser administradas como gotas, solução, suspensão, gel, pomada, líquido de limpeza e/ou por meio de outros veículos.

**[0032]** A presente invenção também apresenta a incorporação de dois siRNA sozinhos ou juntamente com um composto antisséptico.

**[0033]** A presente invenção apresenta como vantagens uma maior penetrabilidade intracelular devido ao uso de sistemas nanométricos no carregamento e administração de siRNA possibilitando o silenciamento de uma proteína importante para a infecção parasitária, através do uso de RNAs de interferência. Também é uma vantagem a possibilidade de tratamento de doenças que possam ser causadas por parasitas oculares utilizando os produtos da presente invenção.

**[0034]** Ainda, os conceitos inventivos comuns a todos os contextos de

proteção reivindicam uma composição oftálmica anti-*Acanthamoeba*, compreendendo carreadores não-virais de tamanho manométrico e dois siRNA adsorvidos com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,001 a 1,0 micrômetro.

**[0035]** 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**

**[0036]** Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras:

**[0037]** A figura 1 demonstra a complexação das formulações com uma sequência de siRNA direcionada à proteína glicogênio fosforilase e serina protease da *Acanthamoeba* (Lorenzo-Morales J, Kliescikova J, Martinez-Carretero E, De Pablos LM, Profotova B, Nohynkova E, Osuna A, Valladares B. Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. Eukaryot Cell. 2008 Mar; 7(3):509-17). Podem ser observadas bandas da sequência (1) siRNA nua, e pode-se observar que as formulações lipossoma com siRNA adsorvido (2), e nanoemulsão com siRNA adsorvido (3) complexaram os siRNA 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®.

**[0038]** A figura 2 mostra os resultados dos tratamentos em experimento *in vivo* em ratos infectados com *Acanthamoeba*. Uma cepa de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 foi utilizada para infecção de ratos *Wistar* (n=5) entre 6 a 8 semanas, que tiveram os olhos previamente examinados e tratados com colírio cloranfenicol, três dias antes do início dos experimentos. Para infecção de ratos com *A. castellanii* ATCC 30010, foi administrada anestesia e foram

aplicados 5 µL de colírio anestésico em cada olho. Em seguida, a córnea de ambos os olhos foi levemente “riscada” três vezes na horizontal e na vertical com uma agulha estéril, apresentando um grau de severidade de leve a moderado. Foi aplicada a suspensão de *Acanthamoeba* no olho direito e tampão fosfato estéril no olho esquerdo (controle). Após a infecção se estabelecer, foram realizados os seguintes tratamentos: Grupo 1: controle sem tratamento, Grupo 2: clorexidina, Grupo 3: lipossoma contendo siRNA com sequência nucleotídica aleatória (scrambled – scr), Grupo 4: lipossoma contendo siRNA contra glicogênio fosforilase e serina protease, Grupo 5: lipossoma contendo – scr mais clorexidina, Grupo 6: lipossoma contendo siRNA contra glicogênio fosforilase e serina protease mais clorexidina. O gráfico demonstra a porcentagem de animais de cada grupo que apresentam a seguinte área de opacidade da córnea: Grau 0: 0%, Grau 1: 0-33%, Grau 2: 33-66%, Grau 3: 66-100%. Pode-se observar que ocorreu grande remissão da infecção e melhora da aparência e área de opacidade da córnea no Grupo 6, que recebeu o lipossoma contendo siRNA contra glicogênio fosforilase e serina protease mais clorexidina.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0039]** As espécies *Acanthamoeba* são agentes oportunistas de infecções disseminadas (principalmente cutâneas e infecções da nasofaringe): uma ulceração da córnea que gera risco à visão chamada ceratite por *Acanthamoeba*, é uma forma fatal de encefalite conhecida como encefalite granulomatosa causada por *Acanthamoeba* (Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. Trends Parasitol. 2006 Apr; 22(4):175-80).

**[0040]** As medidas terapêuticas atuais para a ceratite por *Acanthamoeba* dependem de aplicações tópicas de antimicrobianos, incluindo uma combinação de isetionato de propamidina e neomicina ou clorexidina. No entanto, a duração desses tratamentos torna o processo árduo. Além disso,

como os tratamentos são pouco eficazes contra o estágio de cisto do protozoário, a infecção residual geralmente permanece nesses casos. Nenhum tratamento totalmente efetivo contra a encefalite granulomatosa foi estabelecido, embora medidas terapêuticas tenham sido usadas com efeito aparente como adjuvante à cirurgia (Dart JK, Saw VP, Kilvington S. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol.* 2009 Oct; 148(4):487-499.e2).

**[0041]** Cepas de *Acanthamoeba* patogênicas e não-patogênicas foram isoladas do ambiente, mas os determinantes améebicos vitais à patogênese são pouco compreendidos. Cepas de *Acanthamoeba* patogênicas têm maior tolerância à temperatura, taxas de crescimento e propriedades de aderência; produtos citotóxicos mais secretados; e melhores mecanismos de evasão imune do que as cepas não-patogênicas de *Acanthamoeba* (Khan, N. A. 2003. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb. Pathog.* 34:277-285). A patogênese da infecção por *Acanthamoeba* é dependente de fatores hospedeiros e amebianos, assim como aspectos ambientais, como temperatura e pressão osmótica. Os fatores améebicos pareciam ser mediados pela adesão à célula hospedeira, seguida pela secreção de proteases (principalmente serina proteases), fagocitose e morte direta da célula hospedeira (Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev.* 2006 Jul; 30(4):564-95).

**[0042]** Nesse contexto, o RNAi (RNA de interferência) parece promissor para o silenciamento da expressão gênica em patógenos parasitários, como protozoários e helmintos, bem como vetores de doenças, por interferência de mRNA alvo específica (Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Abreu-Acosta N, Ballart D, Martínez E, Valladares B. RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine proteases genes in *Acanthamoeba*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Mol Biochem Parasitol.* 2005 Nov; 144(1):10-5). A análise das funções gênicas em patógenos de doenças infecciosas e seus vetores é importante para a pesquisa no desenvolvimento

de fármacos, e os efeitos de silenciamento podem ser empregados diretamente no controle da transmissão e desenvolvimento dos parasitas.

**[0043]** O RNA de interferência (siRNA) é o RNA de fita dupla (dsRNA) mais essencial e mais conhecido usado para interferência da expressão gênica. Ele segue a via exógena de silenciamento gênico, pois geralmente não está presente na célula e é incorporado artificialmente, ou pode infectar a célula por meio de certos vírus que possuem o RNA como material genético. Uma vez que pode ser sintetizado artificialmente, pode ser considerado para uso como um agente terapêutico potente. O siRNA é produzido a partir de precursores de dsRNA longos que são ainda formados por dobragem de moléculas de RNA de cadeia simples (ssRNA). Em certos casos, também é produzido usando siRNA primário como modelo e recrutando RNA polimerase dependente de RNA para a reação de síntese. O siRNA é geralmente longo e não pode interagir diretamente com o mecanismo de RNAi para causar o silenciamento do gene. Como resultado, ocorre o processamento do siRNA, que gera um siRNA de 21 a 23 pb que é responsável por causar o silenciamento gênico de um mRNA alvo homólogo (Lorenzo-Morales J, Kliescikova J, Martinez-Carretero E, De Pablos LM, Profotova B, Nohynkova E, Osuna A, Valladares B. Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot Cell*. 2008 Mar; 7(3):509-17).

**[0044]** Desde que o siRNA foi aplicado pela primeira vez no gênero *Acanthamoeba* (Lorenzo-Morales J, Kliescikova J, Martinez-Carretero E, De Pablos LM, Profotova B, Nohynkova E, Osuna A, Valladares B. Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot Cell*. 2008 Mar; 7(3):509-17), alguns genes envolvidos na patogênese de *Acanthamoeba* e na formação de cistos maduros foram silenciados usando siRNA para identificá-los como possíveis alvos para quimioterapia e terapia gênica ou como itens chave em funções (Dudley R, Alsam S, Khan NA. The role of proteases in

the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. FEMS Microbiol Lett. 2008 Sep; 286(1):9-15). Em estudos anteriores, as proteases de serina extracelulares foram silenciadas usando siRNAs, resultando em *Acanthamoeba* não sendo capazes de degradar células da córnea humana. Mais recentemente, foi estabelecido utilizando siRNAs que as proteases de serina também desempenham um papel importante na diferenciação e reemergência do trofozoíto durante o encistamento (Dudley R, Alsam S, Khan NA. The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. FEMS Microbiol Lett. 2008 Sep; 286(1):9-15). Além disso, o papel da glicogênio fosforilase na formação de cistos maduros em *Acanthamoeba* também foi estabelecido recentemente usando o siRNA. Assim, o bloqueio dos caminhos de entrada e saída dessas amebas durante seu processo de patogênese poderia ser conseguido usando essas moléculas de siRNA.

**[0045]** Face ao exposto, para o tratamento de infecções com *Acanthamoeba* utilizando siRNA, e considerando a baixa penetrabilidade intracelular dos siRNA nus, juntamente com as vantagens do uso de sistemas nanométricos no carregamento e administração de siRNA, juntamente com as potencialidades biológicas da administração desses complexos, a presente invenção refere-se a formulações aquosas compreendendo dois siRNA complexados 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.

**[0046]** Para que os carreadores sejam utilizados na via ocular, a administração oftálmica pode se dar através de gotejamento de uma solução, utilização de lentes de contato contendo os carreadores, gel ou pomada oftálmica, dentre outros veículos. E ainda, as composições poderão ser incorporadas em forma de solução, suspensão, gel, pomada, entre outras.

**[0047]** Desta forma, a invenção proporciona métodos e composições que permitem o carregamento de sequências de siRNA específicas para genes que

podem ser utilizados como uma abordagem terapêutica para o tratamento de processos infecciosos causados por *Acanthamoeba*, além do carregamento combinado com um ativo antisséptico.

**[0048]** O processo de fabricação dos produtos compreende uma etapa de homogeneização a alta pressão, microfluidização ou extrusão através de membrana, 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 siRNA, que confere maior proteção contra degradação. Já o processo de fabricação dos lipossomas pode passar apenas por uma etapa de extrusão, homogeneização a alta pressão ou microfluidização ou ainda passar por uma etapa adicional de extrusão manual que confere alta estabilidade aos produtos. Os carreadores contendo ao menos um siRNA para terapia anti-*Acanthamoeba* devem ser utilizados preferencialmente pela via oftálmica.

**[0049]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma composição oftálmica compreendendo ao menos um siRNA, preferencialmente dois siRNA adsorvidos e carreadores não-virais, com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,001 a 1,0 micrômetro, pelo menos um agente antisséptico e pelo menos um polication.

**[0050]** Em uma concretização a composição oftálmica tem uma proporção positiva entre as cargas positivas totais e cargas negativas totais.

**[0051]** Em uma concretização preferencial a proporção entre cargas deve ser entre +2/-1 e +10/-1 (cargas positivas totais/cargas negativas totais).

**[0052]** Em outra concretização preferencial a proporção entre cargas deve ser de +4/-1 (cargas positivas totais/cargas negativas totais).

**[0053]** Em uma concretização a composição oftálmica possui carreador nanométrico que pode ser selecionado do grupo que consiste de nanoemulsão, lipossoma, nanopartícula lipídica sólida, carreador lipídico nanoestruturado, ou uma combinação desses sendo o carreador preferencial o lipossoma.

**[0054]** Em uma concretização os siRNA podem ser adsorvidos no carreador nanométrico e são as SEQ ID NO 1, a SEQ ID NO 2, a SEQ ID NO 3, a SEQ ID NO 4, a SEQ ID NO 5, a SEQ ID NO 6.

**[0055]** Em uma concretização, a composição pode estar na forma de solução, suspensão, gel, pomada, líquido de limpeza, lente de contato, e deve utilizar veículo farmacologicamente aceitáveis.

**[0056]** Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição oftálmica para terapia anti-*Acanthamoeba*, onde a obtenção de carreadores como lipossomas e nanoemulsões contendo os siRNA adsorvidos 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) adicionar siRNA;

(i) adicionar uma solução de polímeros com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL; e

(j) adicionar uma solução de agente antisséptico com concentração de 0,000001mg/mL a 10mg/mL.

**[0057]** Em uma concretização, a solução orgânica descrita na etapa (a) é um solvente orgânico apolar.

**[0058]** Em uma concretização, caso o produto a ser obtido seja o lipossoma, o processo pode compreender a etapa adicional:

**[0059]** (k) 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. 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. Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição oftálmica anti-*Acanthamoeba* para obtenção de carreadores não-virais, incluindo nanoestruturas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os siRNA 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) adicionar siRNA;

(g) adicionar uma solução de polications com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL; e

(h) adicionar uma solução de agente antisséptico com concentração

de 0,0000001mg/mL a 10mg/mL.

**[0060]** 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.

**[0061]** Em uma concretização, uma solução de polications poderá ser adicionada após a formação das nanoestruturas lipídicas ou dos complexos com os siRNA.

**[0062]** Em uma concretização, uma solução de agente antisséptico poderá ser adicionada após a formação das nanoestruturas lipídicas ou dos complexos com os siRNA. 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);
- siRNA;
- Solução de polications (0,001mg/mL a 10mg/mL);
- Solução de agente antisséptico (0,0000001mg/mL a 10mg/mL).

**[0063]** 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);
- siRNA;

- Solução de quitosana (0,001mg/mL a 10mg/mL);
- Solução de clorexidina (0,0000001mg/mL a 10mg/mL).

**[0064]** 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);
- SiRNA;
- Solução de quitosana (0,001mg/mL a 10mg/mL);
- Solução de clorexidina (0,0000001mg/mL a 10mg/mL).

**[0065]** 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);
- SiRNA;
- Solução de quitosana (0,001mg/mL a 10mg/mL);
- Solução de clorexidina (0,0000001mg/mL a 10mg/mL).

**[0066]** 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, o óleo de milho, amendoim, sésamo, oliva, jojoba, soja, álcool graxo, parafina,

triglicerídeos de cadeia média, triglicerídeos de cadeia longa, palmitatos, miristatos e octildodecanol e/ou combinação destes;

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 combinação destes;

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

d) lipídeos neutros;

e) lipídeos catiônicos; e

f) lipídios com ramificação de PEG (peguilados).

**[0067]** Em uma concretização, o agente de tonicidade é escolhido do grupo que compreende sorbitol, etilenoglicol, polietilenoglicol, manitol, glicerol, e/ou combinação destes.

**[0068]** Em uma concretização a solução orgânica pode ser um solvente orgânico escolhido do grupo que compreende solventes orgânicos polares próticos, apróticos ou apolares ou uma combinação dos mesmos, sendo que o solvente orgânico polar prótico é preferencialmente o metanol, e o solvente orgânico apolar ser preferencialmente o clorofórmio.

**[0069]** 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.

**[0070]** Em uma concretização, a solução de agente antisséptico na concentração de 0,0000001mg/mL (p/v) a 10mg/mL (p/v), compreende as biguanidas e amidinas monoméricas ou poliméricas e seus sais, como dibromopropamidina, clorexidina, propamidina, hexamidina, poliexanida; compostos de amônio quaternário e seus sais, como benzetônio, benzalcônio,

cetrimônio, cetilpiridínio, cetrimida, benzoxônio, didecildimetilamônio preferencialmente a clorexidina.

**[0071]** Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso da composição no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas pela infecção de parasitas oculares. Em uma concretização ideal, o uso da composição para preparar um medicamento para o tratamento de ceratites causadas por *Acanthamoeba* spp através da administração ocular ou intraocular.

### **Exemplos - Concretizações**

**[0072]** 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**

**[0073]** A composição deve conter ao menos um siRNA tendo como alvo um gene relacionado à patogênese da *Acanthamoeba* sp., podendo tratar-se de sequências de origem natural ou artificial, podendo ser de fita simples ou dupla.

**[0074]** No sentido da invenção, entende-se por gene alvo notadamente qualquer gene codificando para um produto proteico parasitário que possua relação com sua infecção. O produto proteico assim codificado pode ser uma proteína, um peptídeo, 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 contra o parasita, que, no caso desta invenção é especificamente *Acanthamoeba* sp.

#### **Fase lipídica**

**[0075]** A fase lipídica adequada para a presente invenção é constituída por tensoativos lipofílicos, óleos, lipídeos sólidos e líquidos e/ou mistura desses.

**[0076]** 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).

**[0077]** 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.

**[0078]** 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.

**[0079]** Os lipídios podem ser peguados, isto é, possuindo uma ramificação de polietilenoglicol (PEG) em sua cadeia, como DSPE-PEG, DMPE-PEG, colesterol-PEG, DPPE-PEG (dipalmitoilglicerofoetanolamina-

polietilenoglicol), DLPE-PEG (dilauroilglicerofosfoetanolamina-polietilenoglicol), entre outros.

**[0080]** 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.

**[0081]** Para se obter um efeito ótimo das composições da invenção, as proporções respectivas de siRNA e de lipídio catiônico são, de preferência, determinadas de maneira que a relação cargas positivas do agente de transfecção/cargas negativas dos siRNA seja compreendida entre 1 e 15 e, com maior preferência, entre 2 e 10. Essa relação de cargas pode contabilizar ou não outros lipídios carregados positivamente ou negativamente na formulação, mas deve, obrigatoriamente, ser uma relação de cargas positiva.

**[0082]** 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).

**[0083]** 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.

**[0084]** 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 siRNA, e, com maior preferência, de 2 a 10.

**[0085]** 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).

**[0086]** 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).

**[0087]** 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).

**[0088]** 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

**[0089]** 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

**[0090]** 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.

**[0091]** 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

**[0092]** 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.

**[0093]** 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).

#### Agente antisséptico

**[0094]** Em uma concretização, a solução de agente antisséptico na concentração de 0,0000001mg/mL (p/v) a 10mg/mL (p/v), compreende as biguanidas e amidinas monoméricas ou poliméricas e seus sais, como dibromopropamidina, clorexidina, propamidina, hexamidina, poliexanida; compostos de amônio quaternário e seus sais, como benzetônio, benzalcônio, cetrimônio, cetilpiridínio, cetrimida, benzoxônio, didecildimetilamônio. A adição destes pode ser realizada após a formação das nanoestruturas lipídicas ou dos complexos com os siRNA.

**[0095]** Em uma realização preferencial as formulações descritas na presente invenção compreendem o uso de clorexidina (0,0000001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

#### Solventes orgânicos

**[0096]** 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.

**[0097]** 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.

#### Obtenção das nanoestruturas lipídicas

**[0098]** 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);

h) adicionar agente antisséptico (0,0000001mg/mL a 10mg/mL).

**[0099]** 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;

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

i) adicionar agente antisséptico (0,0000001mg/mL a 10mg/mL).

**[0100]** O processo de obtenção das nanoestruturas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados 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 10 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);

g) adicionar agente antisséptico (0,0000001mg/mL a 10mg/mL).

#### Formulações compreendendo os carreadores lipídicos

**[0101]** Os produtos da presente invenção são formulações que compreendem as nanoestruturas lipídicas, associadas a excipientes adequados, úteis nas áreas farmacêutica e médica.

**[0102]** Os carreadores da presente invenção podem estar sob a forma de

nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.

**[0103]** A composição dos carreadores pode ser diversa, visto que sua efetividade como transportador e protetor do siRNA está intimamente ligada à relação de cargas (cargas positivas totais/ cargas negativas totais, que deve ser positiva), e em menor grau relacionada à formulação do carreador propriamente dita. A principal característica dos carreadores está na sua relação de cargas em relação ao siRNA, assim, modifica-se o carreador mas as propriedades permanecem semelhantes.

**[0104]** Em uma concretização, as composições poderão ser incorporadas em forma de solução, suspensão, gel, pomada, entre outras.

#### Especificação das nanopartículas lipídicas

**[0105]** 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 siRNA.

**[0106]** Determinação do diâmetro de gotícula/partícula e do índice de polidispersão (IPD):

**[0107]** 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° 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

**[0108]** 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 siRNA

**[0109]** A complexação dos siRNA com as formulações foi verificada através de eletroforese em gel de agarose. Os complexos foram avaliados na relação de cargas +4/ -1 (cargas positivas totais/ cargas negativas totais) 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). 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 siRNA por adsorção.

##### **[0110]** Composição final:

###### Fase lipídica

- a. 5,0 g triglicerídeos de cadeia média
- b. 0,25 g DOPE
- c. 0,5 g DOTAP
- d. 0,125 g DSPE-PEG

###### Fase aquosa

- a. 2,25 g Glicerol
- b. 33,38 mg siRNA para a proporção +4/-1 (cargas positivas totais/ cargas negativas totais)
- c. 0,1 mg quitosana
- d. 5,0 mg clorexidina
- e. 100,0 mL de água purificada livre de RNases

##### Procedimento:

**[0111]** 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, o siRNA foi adicionado à formulação e após, a solução de quitosana e a solução de clorexidina.

**[0112]** Produto obtido: Nanoemulsão (NA).

**[0113]** Resultados:

- Tamanho: 261 nm
- IPD: 0,13
- Potencial zeta: +43,6 mV
- Taxa de complexação: 100%. Ver figura 1.

**Exemplo 2: Nanocarreador lipídico consistindo de um lipossoma com complexação do siRNA por adsorção.**

**[0114]** Composição:

Fase lipídica

- a. 0,25 g DOPE
- b. 0,5 g DOTAP
- c. 0,125 g DSPE-PEG

Fase aquosa

- a. 2,25 g Glicerol
- b. 33,38 mg siRNA para a proporção +4/-1 (cargas positivas totais/ cargas negativas totais)
- c. 0,1 mg quitosana
- d. 5,0 mg clorexidina

e. 100,0 mL de água purificada livre de RNases

Procedimento:

**[0115]** 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 o menor possível e com menor índice de polidispersão. Após, extrusou-se a formulação obtida 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. Por fim, os siRNAs, a solução de quitosana e a solução de clorexidina foram adicionadas à formulação.

**[0116]** Produto obtido: Lipossoma (LA).

**[0117]** Resultados:

-Tamanho: 168 nm

-IPD: 0,12

-Potencial zeta: +37,8 mV

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

**Exemplo 3: Nanocarreador lipídico consistindo de uma nanopartícula lipídica sólida com complexação do siRNA por adsorção**

**[0118]** Composição:

Fase orgânica

a. 1,4 g Monoestearato de glicerila

- b. 0,6 g DOTAP

#### Fase aquosa

- a. 1,0 g Polissorbato 80
- b. 2,25 g Glicerol
- c. 33,38 mg siRNA para a proporção +4/-1 (cargas positivas totais/ cargas negativas totais)
- d. 0,1 mg quitosana
- e. 5,0 mg clorexidina
- f. 100,0 mL de água purificada livre de RNases

#### Procedimento:

**[0119]** 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, adicionou-se os siRNA, a quitosana e a clorexidina.

**[0120]** Produto obtido: Nanopartícula lipídica sólida.

**[0121]** Resultados:

-Tamanho: 390 nm

-IPD: 0,34

-Potencial zeta: +10,12 mV

**Exemplo 4: Nanocarreador lipídico consistindo de um carreador lipídico nanoestruturado.**

**[0122] Composição:**

Fase orgânica

- a. 1,0 g Monoestearato de glicerila
- b. 0,5 g DOTAP
- c. 0,5 g triglicerídeos de cadeia média

Fase aquosa

- a. 1,0 g Polissorbato 80
- b. 2,25 g Glicerol
- c. 33,38 mg siRNA para a proporção +4/-1 (cargas positivas totais/ cargas negativas totais)
- d. 50 mg quitosana
- e. 50 mg clorexidina
- f. 100,0 mL de água purificada livre de RNases

**Procedimento:**

**[0123]** 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, adicionou-se os siRNA, a quitosana e a clorexidina.

**[0124]** Produto obtido: Carreador lipídico nanoestruturado.

**[0125]** Resultados:

-Tamanho: 288 nm

-IPD: 0,27

-Potencial zeta: +8,29 mV

#### Administração ocular

**[0126]** Para a entrega dos carreadores lipídicos contendo siRNA para fins de terapia anti-*Acanthamoeba*, a invenção proporciona a administração ocular *in vivo*. Esta administração pode se dar com gotas, por adsorção em lentes de contato, por utilização de solução de limpeza, pomada ou gel oftálmicos, e/ou por meio de outros veículos.

Exemplos de aplicação do produto obtido de acordo com o exemplo 2, acima descrito:

#### Ensaio *in vivo* em modelo murino de ceratite por *Acanthamoeba*

**[0127]** Como modelo animal, foram utilizados ratos como modelo de ceratite por *Acanthamoeba*. Uma cepa de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 foi utilizada para infecção de ratos *Wistar* (n=5) entre 6 a 8 semanas, que tiveram os olhos previamente examinados e tratados com colírio cloranfenicol, três dias antes do início dos experimentos. Para infecção de ratos com *A. castellanii* ATCC 30010, foi administrada anestesia e foram aplicados 5 µL de colírio anestésico em cada olho. Em seguida, a córnea de ambos os olhos foi levemente “riscada” três vezes na horizontal e na vertical com uma agulha estéril, apresentando um grau de severidade de leve a moderado. Foi aplicada a suspensão de *Acanthamoeba* no olho direito e PBS estéril no olho esquerdo (controle).

**[0128]** Todos os procedimentos com animais foram realizados no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, 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.

#### Construção das sequências de siRNA

**[0129]** Duas sequências de siRNA tendo como alvo a proteína glicogênio fosforilase e a proteína serina protease de *Acanthamoeba* foram utilizadas, construídas de acordo com Lorenzo-Morales e colaboradores (Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, et al. Therapeutic Potential of a Combination of Two Gene-Specific Small Interfering RNAs against Clinical Strains of *Acanthamoeba*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(12):5151-5155. doi:10.1128/AAC.00329-10).

**[0130]** As seguintes sequências foram utilizadas tendo como alvo a glicogênio fosforilase (SEQ ID NO 1 - GP senso 5'-CCGGCUACCGCACCAACAA-3' e SEQ ID NO 2 - GP antisenso 3'-UUGUUGGUGCGGUAGCCGG-5') e serina protease (SEQ ID NO 3 - SP senso 5'-CACGGCACUCACGUU-3' e SEQ ID NO 4 - SP antisenso 3'-GUGCCGUGAGUGCAA-5'). Uma sequência scrambled baseada na green fluorescent protein (GFP) também foi utilizada como controle negativo (SEQ ID NO 5 - SCR senso 5'-CAAGCUGACCCUGAAGUUC-3' e SEQ ID NO 6 - SCR antisenso 3'-GUUCGACUGGGACUUCAAG-5').

#### Tratamentos

**[0131]** Após a infecção se estabelecer, foram realizados os seguintes tratamentos: Grupo 1: controle sem tratamento, Grupo 2: clorexidina, Grupo 3: lipossoma contendo siRNA - SCR, Grupo 4: lipossoma contendo siRNA contra glicogênio fosforilase e serina protease, Grupo 5: lipossoma contendo siRNA - SCR mais clorexidina, Grupo 6: lipossoma contendo siRNA contra glicogênio fosforilase e serina protease mais clorexidina.

### Mensuração da área de opacificação da córnea

**[0132]** Foi realizada a mensuração da área de opacificação da córnea dos animais no tempo zero e após 15 de tratamento, O gráfico (Figura 2) demonstra a porcentagem de animais de cada grupo que apresentam a seguinte área de opacidade da córnea: Grau 0: 0%, Grau 1: 0-33%, Grau 2: 33-66%, Grau 3: 66-100%. Pode-se observar que ocorreu grande remissão da infecção e melhora da aparência e área de opacidade da córnea no Grupo 6, que recebeu o lipossoma contendo siRNA contra glicogênio fosforilase e serina protease mais clorexidina.

### Equivalentes

**[0133]** 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.

**[0134]** Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

### **Reivindicações**

1. Composição oftálmica **caracterizada** por compreender ao menos um siRNA tendo como alvo a *Acanthamoeba* sp., pelo menos um agente antisséptico, pelo menos um polycation e ao menos um carreador nanométrico.

2. Composição oftálmica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por ter uma proporção positiva entre as cargas positivas totais e as cargas negativas totais.

3. Composição oftálmica de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo carreador nanométrico ser selecionado do grupo que consiste de nanoemulsão, lipossoma, nanopartícula lipídica sólida ou carreador lipídico nanoestruturado ou uma combinação destes, sendo o carreador preferencial o lipossoma.

4. Composição oftálmica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo siRNA a ser adsorvido no carreador nanométrico e ser a SEQ ID N°1 e a SEQ ID N° 2, ou a SEQ ID N° 3, e a SEQ ID N° 4 ou uma combinação destas.

5. Composição oftálmica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizada** por estar em forma de solução, suspensão, gel, pomada, líquido de limpeza, lente de contato ou um veículo farmacologicamente aceitável.

6. Processo de obtenção da composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** por compreender a nanoemulsão com complexação do siRNA por adsorção, pelas 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) adição dos siRNA;

(i) adicionar uma solução de polications com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL; e

(j) adicionar uma solução de agente antisséptico com concentração de 0,0000001mg/mL a 10mg/mL.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, para a obtenção do lipossoma, **caracterizado** por compreender a etapa adicional:

(k) 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.

8. Processo de obtenção da composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pela obtenção de nanoestruturas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados, que compreendem 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) adicionar siRNA;

(g) adicionar uma solução de polications com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL; e

(h) adicionar uma solução de agente antisséptico com concentração de 0,0000001mg/mL a 10mg/mL.

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, **caracterizado** por conter siRNA em uma proporção em que a composição tenha carga total positiva.

10. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, **caracterizado** pela fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção das nanoemulsões compreenderem na fase lipídica:

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

na fase aquosa

- glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p),
- siRNA
- solução de polications (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v),
- solução de agente antisséptico (0,0000001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v);

em que, a fase lipídica do processo de obtenção das lipossomas compreende a ausência da adição do triglicerídeo de cadeia média; a fase lipídica do processo de obtenção das nanopartículas lipídicas sólidas compreendem apenas o monoestearato de glicerila (2,0% p/p a 10,0% p/p) e o DOTAP

(0,5% p/p a 5,0% p/p); e no processo de obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados compreendem na fase lipídica uma 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); e a fase aquosa compreende 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), uma solução de polications (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v), e uma solução de agente antisséptico (0,0000001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, **caracterizado pela** fase lipídica ser escolhida do grupo que consiste de:

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

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 combinação destes;

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

d) lipídeos neutros;

e) lipídeos catiônicos; e

f) lipídios com ramificação de PEG (peguilados).

12. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, **caracterizado** pelo agente de tonicidade ser escolhido do grupo que compreende sorbitol, etilenoglicol, polietilenoglicol, manitol, glicerol, e/ou combinação destes

13. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9,

**caracterizado** pela solução orgânica ser um solvente orgânico escolhido do grupo que compreende solventes orgânicos polares próticos, apróticos ou apolares ou uma combinação dos mesmos, sendo que o solvente orgânico polar prótico ser preferencialmente o metanol, e o solvente orgânico apolar ser preferencialmente o clorofórmio.

14. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, **caracterizado** pela adição de uma solução de polications ser selecionada do grupo que consiste de 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 siRNA.

15. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, **caracterizado** pelo agente antisséptico ser selecionado do grupo que consiste de biguanidas e amidinas monoméricas ou poliméricas e seus sais, como dibromopropamidina, clorexidina, propamidina, hexamidina, poliexanida; compostos de amônio quaternário e seus sais, como benzetônio, benzalcônio, cetrimônio, cetilpiridínio, cetrimida, benzoxônio, didecildimetilamônio, ou combinação destes, preferencialmente a clorexidina; a adição do agente antisséptico pode ser realizada antes ou após a formação das nanoestruturas lipídicas ou dos complexos com os siRNA.

16. Uso da composição oftálmica, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** por ser para preparar um medicamento para tratar ceratites causadas por *Acanthamoeba* spp.

**FIGURAS**

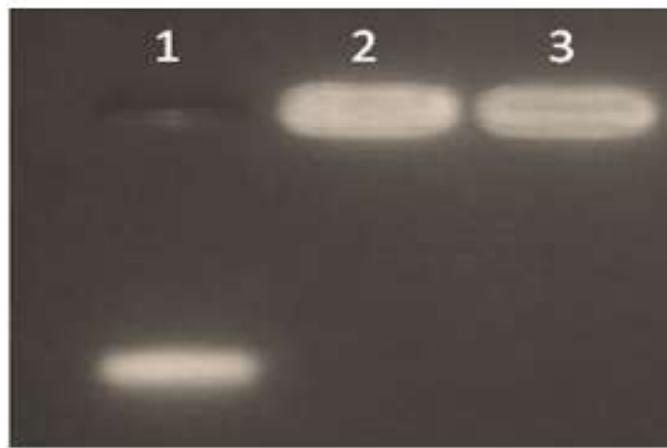


Figura 1

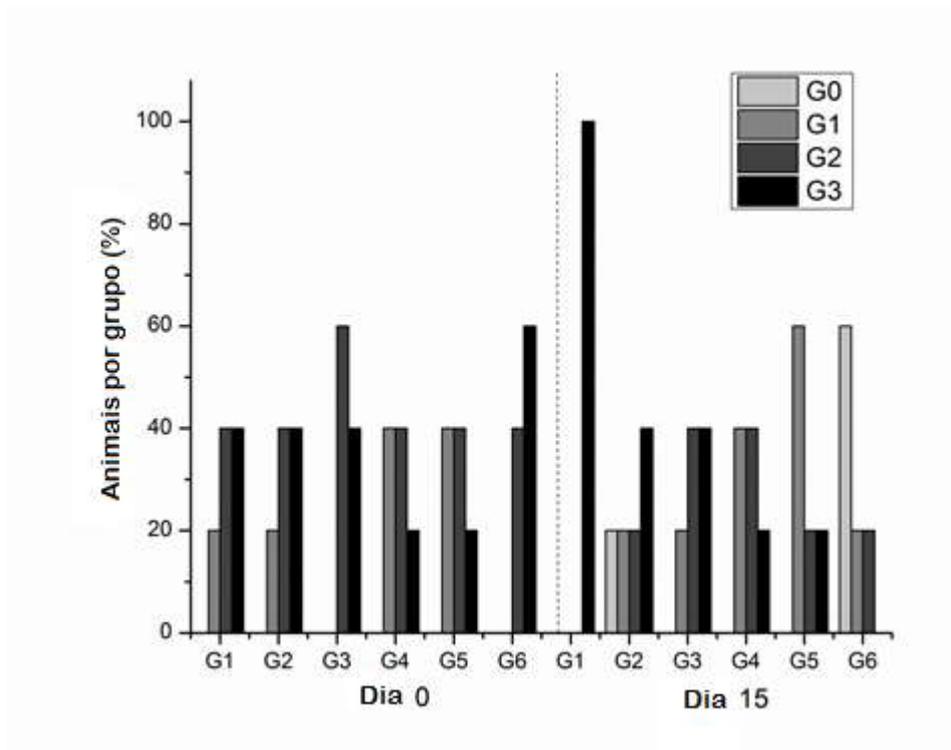


Figura 2

**Resumo****COMPOSIÇÃO OFTÁLMICA, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA**

A presente invenção descreve uma composição para ser utilizada por via oftálmica como terapia contra parasitas oculares, compreendendo carreadores não-virais de tamanho nanométrico ( $< 1,0$  micrômetro) complexados com ao menos um siRNA e um agente antisséptico para fins de terapia oftálmica tendo como alvo principal a ceratite causada por *Acanthamoeba* spp, e ainda os processos de obtenção de tais carreadores. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia e consiste primariamente de formulações aquosas que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica e médica.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: UFRGS - Composição Oftálmica - Listagem de Sequências -
- Data de Geração do Código: 03/08/2018
- Hora de Geração do Código: 16:35:02
- Código de Controle:
  - Campo 1: 6A9AEB9D04C84D12
  - Campo 2: 16EB9587279958CC