



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

(21) BR 102020004988-7 A2



(22) Data do Depósito: 12/03/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 30/11/2021

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO NASAL PARA ENTREGA DE ENZIMA RECOMBINANTE, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA

(51) **Int. Cl.:** A61K 38/47; C07D 311/36; A61K 9/107; A61K 9/127; A61P 43/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL; HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE.

(72) **Inventor(es):** EDUARDA PIOVESAN FRANCESCHI; ROSELENA SILVESTRI SCHUH; HELDER FERREIRA TEIXEIRA; GUILHERME BALDO; URSULA DA SILVEIRA MATTE.

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO NASAL PARA ENTREGA DE ENZIMA RECOMBINANTE, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA. A presente invenção descreve a composição de uma formulação contendo a isoflavona genisteína como vetor para a forma recombinante da enzima iduronidase, com tamanho nanométrico (menor 1,0 micrômetro) a fim de ser administrado in vivo para fins de tratamento da mucopolissacaridose tipo I. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia e consiste em formulações que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica e médica.

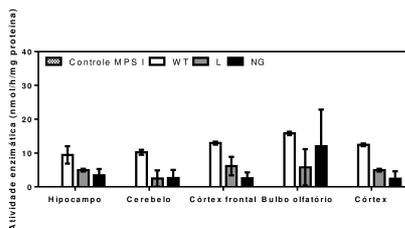


Figura 3. Atividade enzimática de laronidase mensurada nos tecidos cerebrais após administração nasal de camundongos MPS I com L ou NG. MPS I: mucopolissacaridose tipo I; MPS I grupo controle MPS I não-tratado; WT: grupo controle normal *wild type* não-tratado; L: lipossoma contendo laronidase associada; NG: nanoemulsão contendo genisteína e laronidase associadas.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSIÇÃO NASAL PARA ENTREGA DE ENZIMA RECOMBINANTE, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve a composição de uma formulação contendo a isoflavona genisteína como um mecanismo de entrega da forma recombinante da enzima iduronidase, com tamanho nanométrico (< 1,0 micrômetro) a fim de ser administrado *in vivo* para fins de tratamento da mucopolissacaridose tipo I. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia e consiste em formulações que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica e médica.

Antecedentes da Invenção

[0002] A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença de lisossômica causada pela deficiência da enzima α -L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76), que resulta na ausência de degradação e acúmulo dos glicosaminoglicanos (GAG) sulfato de heparano (SH) e sulfato de dermatano (SD) nas células. As consequências são sinais e sintomas multissistêmicos que se apresentam como opacificação da córnea, cardiopatia, perda auditiva, problemas respiratórios, hepatoesplenomegalia, limitação de mobilidade articular e inclusive pode ocorrer dano nas funções cognitivas, o que limita significativamente a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes (NEUFELD, E. F. MUENZER J. The mucopolysaccharidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th Edition. New York: McGraw-Hill, 3421-3452. 2001).

[0003] As manifestações clínicas são heterogêneas, sendo reconhecidas três formas principais: MPS IH ou Síndrome de Hurler (forma grave), MPS IH/S ou Síndrome de Hurler-Scheie (forma intermediária) e MPS IS ou Síndrome de Scheie (forma atenuada). A expectativa de vida é geralmente limitada à infância na forma MPS IH e à adolescência na forma intermediária, e pode ser normal na forma mais branda (NEUFELD; MUENZER, 2001; NEUFELD, E. F. MUENZER J. The mucopolysaccharidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th Edition. New York: McGraw-Hill, 3421-3452. 2001). A incidência mundial estimada da MPS I é de cerca de 1:100.000 nascidos vivos e entre 50 a 80% dos pacientes têm a forma mais grave da doença (MUENZER, J. BECK, M. ENG, C. M. ESCOLAR, M. L. GIUGLIANI, R. GUFFON, N. H. HARMATZ, P. KAMIN, W. KAMPMANN, C. KOSEOGLU, S. T. LINK, B. MARTIN, R. A. MOLTER, D. W. ROJAS, M. V. M. Multidisciplinary management of Hunter syndrome. Pediatrics, 124(6): 1228-1239. 2009). Há dois tratamentos disponíveis para a MPS I, o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) e a terapia de reposição enzimática (TRE).

[0004] O TCTH permite que as células transplantadas produzam e distribuam a enzima aos diferentes órgãos através da reconstituição do sistema hematopoiético (MUENZER, J. BECK, M. ENG, C. M. ESCOLAR, M. L. GIUGLIANI, R. GUFFON, N. H. HARMATZ, P. KAMIN, W. KAMPMANN, C. KOSEOGLU, S. T. LINK, B. MARTIN, R. A. MOLTER, D. W. ROJAS, M. V. M. Multidisciplinary management of Hunter syndrome. Pediatrics, 124(6): 1228-1239. 2009). Contudo, devido aos riscos associados à terapia (como morbidade e mortalidade causadas pela doença do enxerto contra o hospedeiro) este tratamento é indicado apenas em situações específicas, as quais incluem pacientes com a forma grave da doença (MPS IH) e com até 2 anos de idade (BONFIM, C. KOLISKI, A. BITENCOURT, M. SETUBAL, D. FUNKE, V. RUIZ, J. COUTINHO, E. OLIVEIRA M. MEDEIROS, L. ZANIS-NETO, J. MEDEIROS,

C. R. CAT, I. PASQUINI, R. Stem cell Transplantation for inborn errors of metabolism: a single center experience in 20 patients. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 1:52. 2007). Outras limitações do tratamento são a dificuldade de encontrar doadores compatíveis e a ausência de efeito sobre as deformidades ósseas e neurológicas já estabelecidas no momento do transplante (GIUGLIANI, R. FEDERHEN, A. ROJAS, M. V. M. VIEIRA, T. A. ARTIGALÁS, O. PINTO, L. L. C. AZEVEDO, A. C. ACOSTA, A. X. Terapia de reposição enzimática para as mucopolissacaridoses I, II e VI: recomendações de um grupo de especialistas brasileiros. *Rev Assoc Med Bras*, 56(3): 257-77. 2010.). A terapia é iniciada após o aparecimento de lesões ósseas irreversíveis, que já podem existir antes do nascimento (MARTIN, J. J. CEUTERICK, C. Prenatal pathology in mucopolysaccharidoses: a comparison with postnatal cases. *Clin Neuropathol* 2:122–127, 1983; HINEK, A. WILSON, S. E. Impaired elastogenesis in Hurler disease: dermatan sulfate accumulation linked to deficiency in elastinbinding protein and elastic fiber assembly. *Am J Pathol* 156: 925–938. 2000).

[0005] A TRE para a MPS I é realizada através da administração intravenosa de laronidase (Aldurazyme®, Genzyme Corporation), uma proteína análoga à humana α -L-iduronidase, com um peso molecular de 83 kD, produzida por tecnologia de DNA recombinante em uma linhagem celular de ovário de hamster. O objetivo da terapia é fornecer enzimas xenogênicas para a absorção dos lisossomos, assim, aumentar o catabolismo de GAGs e impedir sua formação nos tecidos. A captação da laronidase pelas células nos lisossomos é provavelmente mediada pelas cadeias oligossacarídicas terminadas com manose-6-fosfato da laronidase. A dose recomendada é de 0,58 mg/kg administrada numa base semanal como uma perfusão intravenosa (GENZYME THERAPEUTICS. Aldurazyme® (Enzima Recombinante Laronidase). www.aldurazyme.com/pdf/az_us_hc_pi.pdf, 2010).

[0006] As alternativas terapêuticas atuais não são completamente satisfatórias, visto que não são eficazes em tratar todo o quadro clínico da doença. Assim, tem-se buscado novas terapias para a MPS I, como a terapia de redução de substrato, que visa à redução da síntese do material acumulado, a fim de prevenir ou limitar o armazenamento lisossomal. Essa abordagem foi utilizada com sucesso na doença de Gaucher e Niemann – Pick tipo C (HOLLAK, C. E. M. WIJBURG, F. A. Treatment of lysosomal storage disorders: successes and challenges. *J Inherit Metab Dis* 37: 587–598. 2014).

[0007] Nesse contexto, alguns estudos demonstraram que a genisteína poderia reduzir a expressão de genes que codificam uma ou mais enzimas envolvidas na síntese de GAG (NIKITOVIC, D. TSATSAKIS, A. M. KARAMANOS, N. K. TZANAKAKIS, G. N. The effects of genistein on the synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans by two osteosarcoma cell lines depends on tyrosine kinase and the estrogen receptor density. *Anticancer Res* 23: 459–464, 2003). Estudos anteriores demonstraram que a genisteína inibe a síntese de GAG em fibroblastos da MPS (JAKOBKIEWICZ- BANECKA et al., 2009; PIOTROWSKA et al., 2006). Foram testados os efeitos de compostos derivados da genisteína na redução do acúmulo de GAG, seis foram descritos tão efetivos quanto a genisteína e apenas dois melhores do que o composto de origem. A passagem pela barreira hematoencefálica destas substâncias foi predita por software computacional (KLOSKA, A. NARAJCZYK, M. JAKÓBKIEWICZ- BANECKA, J. GRYNKIEWICZ, G. SZEJA, W.; GABIG-CIMIŃSKA, M. WĘGRZYN, G. Synthetic genistein derivatives as modulators of glycosaminoglycan storage. *Journal of Translational Medicine*, 10:153, 2012).

[0008] Apesar de muitos estudos demonstrarem a administração da genisteína em sua forma livre, essa possui características hidrofóbicas, que limitam a sua biodisponibilidade (BIRT, D F. HENDRICH, S. WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*,

v. 90,p. 157-177, 2001; ZHANG, H. WANG. L. SUN, Y. B- Ring is the active center for genistein to Scavenge peroxy radical: A DTF Study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 13, p. 909-911, 2003). Essa característica remete à necessidade de utilizar formas de administração alternativas que permitam o aumento da biodistribuição desse composto, e os carreadores lipídicos demonstram as características adequadas para incorporar substâncias em seu núcleo oleoso. Nanoemulsões O/A são sistemas compostos por um núcleo oleoso estabilizado por tensoativos formando gotículas dispersas em uma fase externa aquosa (SCHUH, R. S. BALDO, G. TEIXEIRA, H. F. *Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses. Journal Expert Opinion on Drug Delivery. Volume 13, - 1709-1718, Issue 12, 2016*). Essas nanoestruturas podem carrear compostos lipofílicos em seu núcleo oleoso, possibilitando a associação da genisteína e sua proteção contra degradação (ARGENTA, D. F. BIDONE, J. MISTURINI, F. D. KOESTER, L. S. BASSANI, V. L. SIMÕES, C. M. O. TEIXEIRA, H. F. *In Vitro Evaluation of Mucosa Permeation/Retention and Antiherpes Activity of Genistein from Cationic Nanoemulsions. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Vol. 16, 1282–1290, 2016*) de forma segura para administração por diversas vias, inclusive pela via nasal (Fraga M, de Carvalho TG, Diel D, Bruxel F, Kretzmann Filho NA, Teixeira HF, Matte U. *Cationic nanoemulsions as a gene delivery system: proof of concept in the mucopolysaccharidosis I murine model. J Nanosci Nanotechnol. 15: 810-816,2015; SCHUH et al., 2018*). Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram a incorporação eficiente da genisteína (1 mg/mL) em nanoemulsões compostas de um núcleo de triglicerídeos de cadeia média estabilizado pela combinação de fosfolídeos e tensoativos não iônicos (SILVA, A. P. C, KOESTER, L. S., MAYORGA, P., BASSANI, V. L., TEIXEIRA, H. *Development and validation of a LC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. Pharmazie, v. 62, p. 732-734, 2007; ARGENTA, D. F. BIDONE, J. MISTURINI, F. D. KOESTER, L. S. BASSANI, V. L. SIMÕES, C.*

M. O. TEIXEIRA, H. F. In Vitro Evaluation of Mucosa Permeation/Retention and Antiherpes Activity of Genistein from Cationic Nanoemulsions. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 16, 1282–1290, 2016). De forma com que Lyu et al., avaliaram a atividade anti-herpética de alguns flavonóides, incluindo a genisteína, e relatam que a mesma ofereceu baixa toxicidade frente às células testadas (LYU et al., 2005).

[0009] A utilização da terapia combinada entre a enzima recombinante laronidase e a isoflavona genisteína associados em uma nanoemulsão aumentam as probabilidades da diminuição na produção de substrato em tecidos afetados pela MPS I, e conseqüente aumento da degradação de GAGs que já se encontram acumulados no organismo, utilizando diferentes vias para agir na redução de substrato que são descritos na literatura para os compostos citados.

[0010] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0011] Foi relatada a obtenção de uma solução a fim de administrar pela via intracerebroventricular (IV) a enzima 2-iduronato sulfatase para tratamento da MPS II (Síndrome de Hunter), tecnologia que está protegida pelo registro PCT/KR2016/015060 de 30/12/2015, que difere da tecnologia aqui descrita por não se tratar de uma formulação nanotecnológica.

[0012] A tecnologia protegida pelo pedido PCT/US2015/059966, 09/06/2015, descreve o desenvolvimento da obtenção de um peptídeo carreador para as formas recombinantes das enzimas alfa-L-iduronidase (IDUA), 2-iduronato sulfatase (IDS) e alfa-galactosidase A (alfa-Gal A) a fim de ser utilizado no tratamento de doenças genéticas causadas pela insuficiência das mesmas, que difere da presente tecnologia por não envolver uma formulação nanotecnológica.

[0013] A tecnologia protegida pelo número WO 2005/021064 descreve a utilização de um método para a administração intratecal de uma forma recombinante da enzima Iduronidase em solução composta por tampão fosfato e

Tween para o tratamento de doenças com acúmulo lisossomal. Entretanto, não há semelhanças em relação à presente descrição, visto que a formulação descrita nessa minuta é muito mais elaborada e vislumbra administração por via nasal.

[0014] A tecnologia protegida pelo registro PCT/US2018/015910, 30/01/2018 descreve métodos para a obtenção de uma forma recombinante da enzima iduronidase e entrega ao sítio de ação através de uma injeção no líquido cefalorraquidiano em um indivíduo portador de MPS I, diferente do que é descrito na presente invenção.

[0015] A tecnologia protegida pelo número PCT/US2017/018829 descreve a utilização de vetores virais, como adenovírus associados, capazes de fornecer uma alternativa de edição gênica e acarretar o direcionamento de IDUA para a córnea a fim de prevenir cegueira e reduzir a turvação dos olhos em pacientes acometidos pela MPS I, diferindo da via de administração e forma de entrega da presente invenção.

[0016] A tecnologia protegida pelo número PCT/CA2013/050453, relata a incorporação e utilização de uma fração de dendrímeros no tratamento da MPS I. Esses conjugados interagem com a forma recombinante da enzima iduronidase, e em princípio são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, além de tratar sintomas periféricos, entretanto diferem da presente descrição pois não envolvem vetores lipídicos em sua composição.

[0017] A invenção PCT/US2016/045715, descreve uma modificação em relação a um aminoácido que possa melhorar o desempenho da enzima beta-glucuronidase humana que age na degradação do glicuronato presente nos glicosaminoglicanos, causando conseqüente diminuição os níveis de glicosaminoglicanos no paciente com Mucopolissacaridose VII, não envolvendo vetores para entrega da enzima.

[0018] A invenção PCT/US2017/182134 refere-se à administração intratecal da forma recombinante da enzima iduronidase para tratar doenças com

distúrbios lisossômicos. Entretanto, não envolve a produção de vetores lipídicos, diferindo da presente invenção.

[0019] 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.

[0020] Frente ao exposto, a solução aqui proposta resolve o problema da ausência de um tratamento absolutamente efetivo e seguro para a mucopolissacaridose tipo I, e ainda trata da obtenção de carreadores eficientes para entrega da enzima recombinante por via nasal, tornando possível a entrega por uma via de administração de não-invasiva.

Sumário da Invenção

[0021] Dessa forma, a presente invenção difere do estado da técnica, compreendendo a utilização de formulação com partículas em escala nanométrica produzida por métodos distintos dos mencionados no estado da técnica, contendo terapia combinada de redução de substrato e terapia de reposição enzimática buscando a utilização da via nasal para administração da mesma, a fim de proporcionar uma adequada vetorização para a isoflavona genisteína e para a forma recombinante da enzima iduronidase transpondo a limitação da barreira hematoencefálica para a distribuição no sistema nervoso central para utilização *in vivo* para fins de tratamento da doença de acúmulo lisossomal mucopolissacaridose tipo I.

[0022] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma composição para utilização por via nasal compreendendo ao menos a forma recombinante da enzima iduronidase, podendo conter a isoflavona genisteína, e carreadores nanométricos lipídicos, com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,01 a 1,0 micrômetro.

[0023] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção onde a produção de carreadores lipídicos nanoemulsionados compreende as etapas de:

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

(b) adicionar a genisteína em proporção de 0,01% p/v a 5% p/v;

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

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

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

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

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

(h) 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;

(i) adicionar a forma recombinante da enzima iduronidase na concentração de 5% p/v a 50% p/v.

[0024] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção onde a produção de carreadores lipídicos lipossomais compreende as etapas de:

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

(b) dissolver entre 0,1% p/v a 5,0% p/v 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 a forma recombinante da enzima iduronidase na concentração de 5% p/v a 50% p/v.

[0025] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso da composição no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças lissossomais. Em uma concretização ideal, o uso da composição será para preparar um medicamento para o tratamento de mucopolissacaridose tipo I através da administração nasal.

[0026] 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.

[0027] Em algumas realizações, as composições nasais para entrega de uma forma recombinante da enzima iduronidase para o tratamento da mucopolissacaridose tipo I podem ser administradas como gotas, solução, suspensão, gel, pomada, líquido de limpeza e/ou por meio de outros veículos.

[0028] A presente invenção também apresenta a incorporação de uma forma recombinante da enzima iduronidase sozinha ou juntamente com a isoflavona genisteína.

[0029] A presente invenção apresenta como vantagens uma maior penetrabilidade intracelular devido ao uso de sistemas nanométricos no carreamento e administração da enzima, bem como a possibilidade de administração pela via nasal também é uma vantagem pois é uma via não-invasiva e permite o alcance do sistema nervoso central.

[0030] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindica uma composição nasal para terapia da mucopolissacaridose tipo I, compreendendo carreadores não-virais de tamanho manométrico e a enzima recombinante, podendo conter a isoflavona genisteína, com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,01 a 1,0 micrômetro.

[0031] Estes 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

[0032] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras 1,2 e 3 em anexo ao final deste documento com os resultados *in vitro* e *in vivo*.

[0033] A figura 1 mostra os resultados de atividade enzimática de laronidase após tratamento de fibroblastos de camundongos MPS I tratados durante 24 horas com lipossoma contendo laronidase (L) ou nanoemulsão contendo genisteína e laronidase (NG) (120 µL, sendo 90 µL de formulação e 30 µL de enzima) e em fibroblastos controle de camundongos MPS I não-tratados.

[0034] Na figura 2 são demonstrados os resultados da atividade enzimática dosada nos tecidos dos animais após tratamento com lipossoma contendo laronidase (L) ou nanoemulsão contendo genisteína e laronidase (NG) (120 µL, sendo 90 µL de formulação e 30 µL de enzima divididas em 6 administrações de 10 µL, 1x/ dia, 1 dia) por via nasal, em animais controle MPS I e controle normais (*wild type*) não-tratados.

[0035] Na figura 3 são demonstrados os resultados da atividade enzimática dosada em diferentes secções do cérebro dos animais após tratamento com lipossoma contendo laronidase (L) ou nanoemulsão contendo genisteína e

laronidase (NG) (120 µL, sendo 90 µL de formulação e 30 µL de enzima divididas em 6 administrações de 10 µL, 1x/ dia, 1 dia) por via nasal, em animais controle MPS I e controle normais (*wild type*) não-tratados.

[0036]

Descrição Detalhada da Invenção

[0037] A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença de lisossômica causada pela deficiência da enzima α -L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76), que resulta na ausência de degradação e acúmulo dos glicosaminoglicanos (GAG) sulfato de heparano (SH) e sulfato de dermatano (SD) nas células (NEUFELD; MUENZER, 2001). As consequências são sinais e sintomas multissistêmicos que se apresentam como opacificação da córnea, cardiopatia, perda auditiva, problemas respiratórios, hepatoesplenomegalia, limitação de mobilidade articular e inclusive pode ocorrer dano nas funções cognitivas, o que limita significativamente a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes (NEUFELD; MUENZER, 2001).

[0038] Existem dois tipos de tratamentos atualmente disponíveis, entretanto ambos não são completamente efetivos, visto que não são eficazes em tratar todo o quadro clínico da doença. Assim, tem-se buscado novas terapias para a MPS I, como a terapia de redução de substrato, que visa à redução da síntese do material acumulado, a fim de prevenir ou limitar o armazenamento lisossomal. Essa abordagem foi utilizada com sucesso na doença de Gaucher e Niemann – Pick tipo C (HOLLAK; WIJBURG, 2014).

[0039] A presente invenção versa sobre composições farmacêuticas direcionadas para uso no tratamento das manifestações heterogêneas e multissistêmicas de doenças de acúmulo lisossomal. Mais particularmente, a presente invenção é baseada na descoberta de composições para entrega nasal que compreendem enzimas deficientes ou inexistentes em distúrbios de armazenamento

lisossômico, o que resulta em intervenção terapêutica clinicamente útil a longo prazo, sustentada, das manifestações do sistema nervoso central dessas doenças. Assim, a presente invenção é direcionada à terapia de reposição enzimática para tais doenças por via nasal.

[0040] Por conseguinte, em um aspecto da presente invenção, é fornecida uma composição farmacêutica compreendendo uma enzima que está deficiente em uma doença de armazenamento lisossômico e compreende ou foi projetada para compreender uma fração que permite que a referida enzima se ligue ao receptor de manose-6-fosfato (M6P) para uso no tratamento de uma doença de armazenamento lisossômico por administração nasal a um mamífero sujeito em uma quantidade eficaz para melhorar os sintomas sistêmicos e neurológicos da referida doença.

[0041] Em formas de realização particularmente preferidas, as composições farmacêuticas da presente invenção proporcionam a administração nasal da forma recombinante da enzima iduronidase para efetuar uma intervenção terapêutica em MPS I. Esse tratamento tem eficácia sobre o sujeito pois reduz ou elimina grânulos de armazenamento de glicosaminoglicanos nos tecidos. Além disso, a administração nasal da enzima em indivíduos neonatais e adultos poderia resultar em níveis terapêuticos de iduronidase no cérebro e a redução ou eliminação de grânulos de armazenamento de glicosaminoglicanos no tecido cerebral.

[0042] Em algumas concretizações, a enzima recombinante será entregue juntamente com a genisteína a fim de contemplar a redução do substrato bem como a degradação da acumulação dos GAGs teciduais.

[0043] Em uma concretização, as nanoestruturas são nanoemulsões ou lipossomas.

[0044] Em uma concretização, a composição para entrega de enzima recombinante compreende excipientes farmacêuticamente adequados.

[0045] Em uma concretização, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição para entrega de enzima recombinante, onde a obtenção

de nanoemulsões compreendem as etapas de:

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

(b) adicionar a genisteína em proporção de 0,01% p/v a 5% p/v;

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

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

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

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

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

(h) 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;

(i) adicionar a forma recombinante da enzima iduronidase na concentração de 5% p/v a 50% p/v.

[0046] Em uma concretização, a presente invenção apresenta um processo de obtenção onde a produção de carreadores lipídicos lipossomais compreende as etapas de:

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

(b) dissolver entre 0,1% p/v a 5,0% p/v 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 a forma recombinante da enzima iduronidase na concentração de 5% p/v a 50% p/v.

[0047] Em uma concretização, a solução orgânica descrita na etapa (a) é um solvente orgânico apolar.

[0048] Em uma concretização, caso o produto a ser obtido seja o lipossoma, o processo pode compreender a etapa adicional:

(h) 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.

[0049] 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.

[0050] Em uma concretização, o solvente orgânico é escolhido entre o grupo que compreende solventes orgânicos polares próticos, apróticos ou apolares e/ou mistura dos mesmos.

[0051] Em uma concretização, o solvente orgânico polar prótico é o metanol e o solvente orgânico apolar é o clorofórmio.

[0052] Em uma concretização, a fase lipídica é escolhida do grupo que compreende:

a) lipídeos líquidos tais como oleato de decila, isoheptadecano, ésteres do ácido esteárico e/ou oleico, 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) tensoativos lipofílicos tais como lecitinas e fosfolipídeos e/ou mistura dos mesmos;

c) lipídeos neutros;

d) lipídeos catiônicos; e

e) lipídios com ramificação de PEG (peguilados).

[0053] Em uma concretização, o agente de tonicidade é escolhido do grupo que compreende sorbitol, etilenoglicol, polietilenoglicol, manitol, glicerol, e/ou mistura destes.

[0054] Em uma concretização, a fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção dos lipossomas compreendem:

fase lipídica:

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

- Lecitina de gema de ovo (0,25% p/p a 5,0% p/p);

e

fase aquosa:

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

- Enzima recombinante laronidase (5% p/v a 50% p/v).

[0055] Em uma concretização, a fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção das nanoemulsões compreendem:

fase lipídica:

- TCM (0,5% p/v a 5,0% p/v);

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

- Lecitina de gema de ovo (0,25% p/p a 5,0% p/p);

- Isoflavona genisteína (0,01% p/v a 5% p/v);

e

fase aquosa:

- Glicerol (0,1% p/v e 5,0% p/v)
- Enzima recombinante laronidase (5% p/v a 50% p/v).

[0056] A presente invenção apresenta como vantagens uma maior penetrabilidade intracelular devido ao uso de sistemas nanométricos no carreamento e administração de enzimas nanoencapsuladas. Também é uma vantagem a possibilidade de tratamento de doenças que possam ser causadas por problemas genéticos que provoquem acúmulo lisossomal utilizando os produtos da presente invenção.

Exemplos - Concretizações

[0057] 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.

Enzima recombinante

[0058] Embora certas modalidades usem a iduronidase como a enzima que está sendo substituída, deve-se entender que os métodos da presente invenção podem ser utilizados para a intervenção terapêutica de outras doenças que requerem a administração de uma enzima diferente. Por exemplo, a presente invenção também contempla a administração nasal de betaglucuronidase (MPS VII), iduronato sulfatase (MPS II), alfa-N-acetilglucosaminidase (MPS IIIB), arilsulfatase A (MLD), glucocerebrosidase, β -glucosidase ou N-acetilgalactosamina 4-sulfatase.

[0059] Além disso, é contemplado que a presença na superfície celular das células de um receptor de alta afinidade para a absorção da enzima, mesmo em baixas concentrações da enzima produzirá um gradiente de concentração que aciona a enzima para atravessar a superfície do cérebro através da interface cérebro-nariz.

[0060] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser

usadas no tratamento de qualquer doença de armazenamento lisossomal que manifesta um efeito no cérebro ou tecido meníngeo e requer que o medicamento entre no cérebro ou meninges. As composições farmacêuticas do presente pedido atingem um efeito terapêutico cruzando a interface cérebro-nariz e melhoram os efeitos deletérios de doenças de armazenamento lisossômico no tecido cerebral. Por exemplo, tal doença pode incluir, mas não está limitada a aspartilglucosaminúria, doença de armazenamento de éster de colesterol, Wolman doença, cistinose, leucodistrofia metacromática, doença de Danon, doença de Fabry, lipogranulomatose de Farber, Farber, fucosidose, galactosialidose tipos I / II, doença de Gaucher tipos I / II / III, doença de Gaucher, leucodistrofia de células globóides, doença de Krabbe, doença de armazenamento de glicogênio II, doença de Pompe, GM1-gangliosidose tipos I / II / III, GM2-gangliosidose tipo I, doença de Tay Sachs, GM2-gangliosidose tipo II, doença de Sandhoff, GM2-gangliosidose, α -manosidose tipos I / II, β -manosidose, leucodistrofia metacromática, mucolipidose tipo I, sialidose tipos I / II, mucolipidose, doença das células I II / III, polidistrofia pseudo-Hurler da mucolipidose tipo IIIC, mucopolissacaridose tipo I, mucopolissacaridose tipo II, síndrome de Hunter, mucopolissacaridose tipo IIIA, síndrome de Sanfilippo, mucopolissacaridose tipo IIIB, mucopolissacaridose tipo IIIC, mucopolissacaridose tipo IIID, mucopolissacaridose tipo IVA, Morquio, mucopolissacaridose tipo IVB síndrome de Morquio, mucopolissacaridose tipo VI, mucopolissacaridose tipo VII, síndrome de Sly, mucopolissacaridose tipo IX, deficiência múltipla de sulfatase, lipofuscinose ceróide neuronal, doença de CLN1 Batten, doença de CLN2 Batten, doença de Niemann-Pick tipos A / B, doença de Niemann-Pick, Niemann-Pick doença tipo C1, doença de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostose, doença de Schindler tipos I / II, doença de Schindler e doença de armazenamento de ácido siálico.

[0061] Em modalidades particularmente preferidas, a doença é

mucopolissacaridose e, mais preferencialmente, a doença é mucopolissacaridose I. Em certas modalidades, o indivíduo com a doença de armazenamento lisossômico tem uma diminuição da atividade normal de α -L-iduronidase. A atividade pode ser diminuída porque a enzima está mutada ou ausente no sujeito. Numa modalidade particular, o mamífero possui cerca de 50% ou menos de uma atividade normal de α -L-iduronidase. Em outras modalidades, o sujeito tem 75% ou menos de uma atividade normal de α -L-iduronidase. Para tratar essa deficiência, os métodos da presente invenção podem empregar uma composição farmacêutica que compreende uma dose de pelo menos cerca de 125.000 unidades ou 0,5 mg/kg de α -L-iduronidase humana. Outras doses preferidas incluem entre cerca de 0,01 mg/15-20 kg de peso corporal do sujeito a cerca de 10 mg/15-20 kg de peso corporal do sujeito. A quantidade pode ser administrada em qualquer dose e em qualquer intervalo convenientemente espaçado, determinado pelo médico que administra o tratamento. Em certas modalidades, a terapia de reposição enzimática é administrada semanalmente a um sujeito que sofre de uma deficiência de uma enzima lisossômica.

[0062] Em modalidades específicas, o distúrbio de armazenamento lisossômico é a MPS I e a enzima é a iduronidase recombinante administrada pela via nasal em uma quantidade de cerca de 0,5 mg a cerca de 20 mg por quilograma de peso corporal. Em modalidades específicas, a quantidade é de cerca de 1,2 mg por quilograma de peso corporal. Mais particularmente, é contemplado que a iduronidase recombinante é administrada em uma dosagem de cerca de 1,0 mg a 100 mg, 2,0 mg a 50 mg ou 10 mg a 100 mg por quilograma de peso corporal. Estas são meras quantidades exemplares de iduronidase e os entendidos na técnica entenderão que essas doses podem variar dependendo da idade do sujeito, tamanho do sujeito, estágio da doença e similar. Em modalidades preferidas, a iduronidase recombinante é administrada em uma dosagem de cerca de 1,0 mg a 15 mg, 2,0 mg a 10 mg ou 10 mg a 5 mg.

[0063] A enzima para a terapia de substituição pode ser preparada a partir de qualquer fonte comumente usada para a preparação dessas enzimas. Em certas modalidades, a enzima é a iduronidase que é secretada e purificada de células de mamíferos em cultura e transfectadas com uma sequência de DNA que codifica a iduronidase humana.

Fase lipídica

[0064] A fase lipídica adequada para a presente invenção é constituída por tensoativos lipofílicos, óleos, lipídeos sólidos e líquidos e/ou mistura desses.

[0065] 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).

[0066] 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.

[0067] 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 (dipalmitoilglicerofosfoetanolamina-polietilenoglicol), DLPE-PEG (dilauroilglicerofosfoetanolamina-polietilenoglicol), entre outros.

[0068] 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.

[0069] 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 glicosildiacilglicerois, 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).

[0070] Em uma realização preferencial os lipossomas descritos na presente invenção compreendem o uso de Lecitina de gema de ovo (0,25% p/p a 5,0% p/p) e DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p).

[0071] Em uma realização preferencial as nanoemulsões descritas na

presente invenção compreendem o uso de Lecitina de gema de ovo (0,25% p/p a 5,0% p/p), DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p) e triglicerídeos de cadeia média (2,0% p/p a 20,0% p/p).

Agentes de tonicidade

[0072] 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.

Solventes orgânicos

[0073] 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.

[0074] 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

[0075] Os processos de obtenção das nanoemulsões compreendem as etapas de:

- (a) dissolver entre 2% p/v e 20% de p/v de fase lipídica em uma solução orgânica;
- (b) adicionar a genisteína em proporção de 0,01% p/v a 5% p/v;
- (c) dissolver entre 0,1% p/v a 5,0% p/v de agente de tonicidade em uma solução aquosa;
- (d) evaporar a solução orgânica obtida na etapa (a), para formar um filme;
- (e) adicionar a solução aquosa obtida na etapa (b) ao filme lipídico obtido na etapa (c);
- (f) deixar descansar o produto obtido na etapa (d) por 4 a 72 horas em uma

temperatura entre 2°C e 20°C;

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

(h) 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;

(i) adicionar a forma recombinante da enzima iduronidase na concentração de 5% p/v a 50% p/v.

[0076] 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, obtendo assim um filme lipídico;

d) adicionar a solução aquosa ao filme lipídico e deixar por 12 a 72 horas em 2°C a 20°C;

e) sonicar a formulação por 5 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.

Formulações compreendendo os carreadores lipídicos

[0077] Os produtos da presente invenção são formulações que compreendem as nanoestruturas lipídicas, associadas a excipientes adequados, úteis nas áreas farmacêutica e médica.

[0078] Os carreadores da presente invenção podem estar sob a forma de nanoemulsões ou lipossomas.

Especificação das nanopartículas lipídicas

[0079] 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.

[0080] Determinação do diâmetro de gotícula/partícula e do índice de polidispersão (IPD):

[0081] 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

[0082] 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.

Exemplo 1: Nanocarreador lipídico consistindo de uma nanoemulsão com encapsulamento de genisteína e associação da enzima recombinante laronidase.

Composição final:

- [0083]** Fase lipídica
- a. 8% p/v Triglicerídeos de cadeia média
 - b. 1,7% p/v Lecitina de gema de ovo
 - c. 0,3% p/p DOTAP
 - d. 0,1% p/v genisteína

[0084] Fase aquosa

- a. 2,25% p/p Glicerol
- b. 25% p/v Enzima recombinante laronidase.

Procedimento:

[0085] 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, a enzima foi adicionada à formulação.

Produto obtido: Nanoemulsão (NEG).

Resultados:

- Tamanho: 213 ± 3.29 nm
- IPD: 0.101 ± 0.01
- Potencial zeta: $+ 41.50 \pm 0.95$ mV
- Taxa de associação da genisteína: 97 ± 0.89 %

Exemplo 2: Nanocarreador lipídico consistindo de um lipossoma com associação da enzima recombinante laronidase.

Composição:

[0086] Fase lipídica

- a. 1,7% p/v Lecitina de gema de ovo
- b. 0,3% p/p DOTAP

[0087] Fase aquosa

- a. 2,25% p/p Glicerol
- b. 25% p/v Enzima recombinante laronidase.

Procedimento:

[0088] 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 vesícula o menor possível e com menor índice de polidispersão. Por fim, a enzima foi adicionada à formulação.

Produto obtido: Lipossoma (LE).

Resultados:

- Tamanho: 210 ± 1.49 nm
- IPD: $0,276 \pm 0.01$
- Potencial zeta: $+40.2 \pm 1.22$ mV

Administração nasal

[0089] 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.

[0090] 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:

Modelo murino de MPS I

[0091] Foi utilizado como modelo animal camundongos nocaute para o gene da *Idua* (murina). Este modelo foi criado por meio da interrupção do éxon 6 do gene *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*.

[0092] 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

preditas 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.

Tratamento de fibroblastos

[0093] Os fibroblastos de camundongos MPS I nocautes para o gene *Idua* foram obtidos por biópsia e cultura primária. Nas passagens 3-4 foram semeadas a 5×10^4 células por poço numa placa de 6 poços e cultivados em DMEM contendo soro fetal bovino a 10% e ampicilina / estreptomicina a 1%.O tratamento foi realizado incubando as células com 120 µL das formulações durante 24 horas.

Atividade enzimática de laronidase

[0094] Após 24 horas, os fibroblastos foram tripsinizados, centrifugados e suspensos em água MilliQ®. Após vórtex, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para avaliar a atividade de IDUA. A atividade de IDUA foi realizada utilizando 4-metilumbeliferil alfa-L-iduronídeo (Glycosynth, Warrington, UK) como substrato. As células foram incubadas a 37 °C durante 1 h em tampão de formato de sódio (pH 2,8). A fluorescência foi medida com excitação de 365 nm e filtros de emissão de 450 nm num espectrofotômetro de fluorescência (SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Os resultados foram calculados em nmol / h / mg de proteína. O teor de proteína foi quantificado utilizando o método descrito por Lowry. Ver Figura 1.

Ensaio *in vivo*

Tratamento

[0095] Um grupo (n=4) foi utilizado para a administração nasal de 60 µl por narina de formulação em seis aplicações de 10 µl cada, totalizando 120 µl de

nanoemulsão contendo genisteína e enzima. Outro grupo (n=4) foi utilizado para a administração nasal de 60 µL por narina de formulação em seis aplicações de 10 µL cada, totalizando 120 µL de lipossoma contendo enzima. Como controles foram utilizados camundongos normais (*wild type*) que não receberam nenhum tratamento (n=4) e camundongos MPS I que não receberam nenhum tratamento (n=4). Os tratamentos foram realizados uma vez por dia, durante 1 dia.

[0096] A dosagem máxima utilizada para camundongos para administração da via nasal é de 120 µL, portanto este foi o volume máximo utilizado no estudo.

Dosagem enzimática sérica

[0097] O nível sérico de laronidase é mensurado nos animais tratados e os resultados são comparados com animais MPS I E normais (*wild type*) não-tratados. A atividade enzimática é avaliada através do ensaio enzimático por método fluorimétrico utilizando o substrato artificial 4-metil-umbeliferil-alfa-L-iduronídeo. A unidade a ser adotada é nmol/ h/ mL de soro. Para isto, o soro é 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 é medida em 365 nm (excitação) e 450 nm (emissão) utilizando o fluorímetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, CA, USA). Neste ensaio, a quantidade de IDUA é medida pela quantidade de substrato clivado em 1 hora. Ver Figura 3.

Equivalentes

[0098] 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 caracterizada por compreender ao menos uma enzima recombinante e ao menos um carreador nanométrico, podendo conter uma isoflavona.
2. Composição, de acordo a reivindicação 1, caracterizada pelas nanoestruturas serem nanoemulsões ou lipossomas.
3. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizada por compreender excipientes farmacologicamente adequados.
4. Processo de obtenção de composição nasal para tratamento da MPS I conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pela obtenção da composição compreender as etapas de:
 - (a) dissolver entre 2% p/v e 20% de p/v de fase lipídica em uma solução orgânica;
 - (b) dissolver entre 0,1% p/v a 5,0% p/v 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 a forma recombinante da enzima iduronidase na concentração de 5% p/v a 50% p/v.
5. Processo de obtenção de composição de acordo com a reivindicação 4, caso o

produto a ser obtido seja a nanoemulsão, caracterizado por compreender a etapa adicional:

(a1) adicionar a genisteína em proporção de 0,01% p/v a 5% p/v;

6. Processo de obtenção de composição de acordo com a reivindicação 7, caso o produto a ser obtido seja o lipossoma, caracterizado por poder 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, 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, de acordo com as reivindicações 4 a 7, 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.

9. Processo de obtenção de composição, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo solvente orgânico polar prótico ser metanol, e o solvente orgânico apolar ser clorofórmio.

10. Processo de obtenção de composição para terapia combinada de redução de substrato e reposição enzimática para entrega no sistema nervoso central, de acordo com as reivindicações 4 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) tensoativos lipofílicos tais como lecitinas e fosfolipídeos e/ou mistura dos mesmos;

c) lipídeos neutros;

d) lipídeos catiônicos; e

e) lipídios com ramificação de PEG (peguilados).

11. Processo de obtenção de composição, de acordo com as reivindicações 4 a 10, caracterizado pelo agente de tonicidade ser escolhido do grupo que compreende sorbitol, etilenoglicol, polietilenoglicol, manitol, glicerol, e/ou mistura destes.

12. Processo de obtenção de composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 11, caracterizado pela fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção dos lipossomas compreenderem:

fase lipídica:

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

- Lecitina de gema de ovo (0,25% p/p a 5,0% p/p);

e

fase aquosa:

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

- Enzima recombinante laronidase (5% p/v a 50% p/v).

13. Processo de obtenção de composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 11, caracterizado pela fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção das nanoemulsões compreenderem:

fase lipídica:

- TCM (0,5% p/v a 5,0% p/v);

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

- Lecitina de gema de ovo (0,25% p/p a 5,0% p/p);

- Isoflavona genisteína (0,01% p/v a 5% p/v);

e

fase aquosa:

- Glicerol (0,1% p/v e 5,0% p/v)
- Enzima recombinante laronidase (5% p/v a 50% p/v).

14. Processo de obtenção de composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 13, caracterizado pela incorporação das composições em forma de solução, suspensão, gel, pó, entre outras formas farmacêuticas.

15. Uso da composição conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por ser no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por deficiências enzimáticas ou anomalias genéticas que possuam acometimento neurológico.

16. Uso da composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por ser no preparo de um medicamento para o tratamento das doenças lisossômicas de depósito, especialmente das mucopolissacaridoses.

17. Uso da composição para terapia combinada de redução de substrato e reposição enzimática para entrega no sistema nervoso central de acordo com as reivindicações 15 ou 16, caracterizada pela administração ser nasal tendo como alvo o sistema nervoso central.

FIGURAS

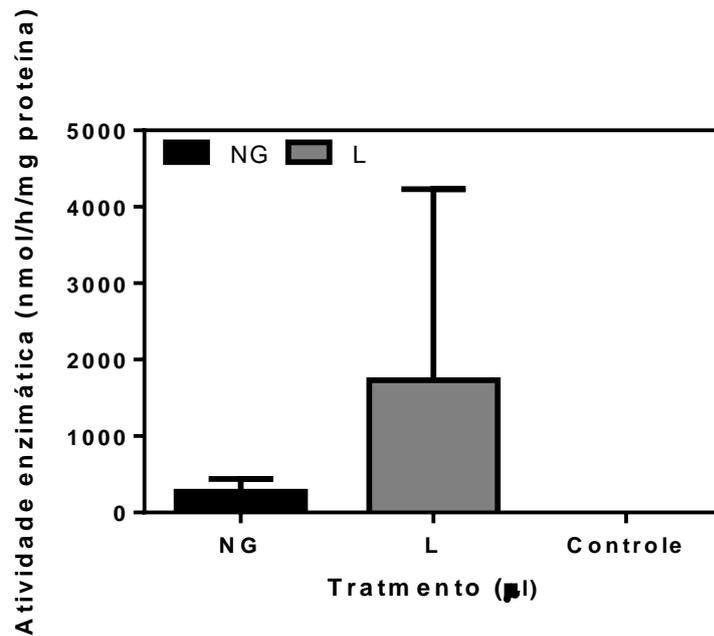


Figura 1. Atividade enzimática da laronidase em fibroblastos MPS I após tratamento com L e NG. L: lipossoma contendo laronidase associada; NG: nanoemulsão contendo genisteína e laronidase associadas; Controle: fibroblastos de camundongos MPS I; MPS I: mucopolissacaridose tipo I.

Figura 1

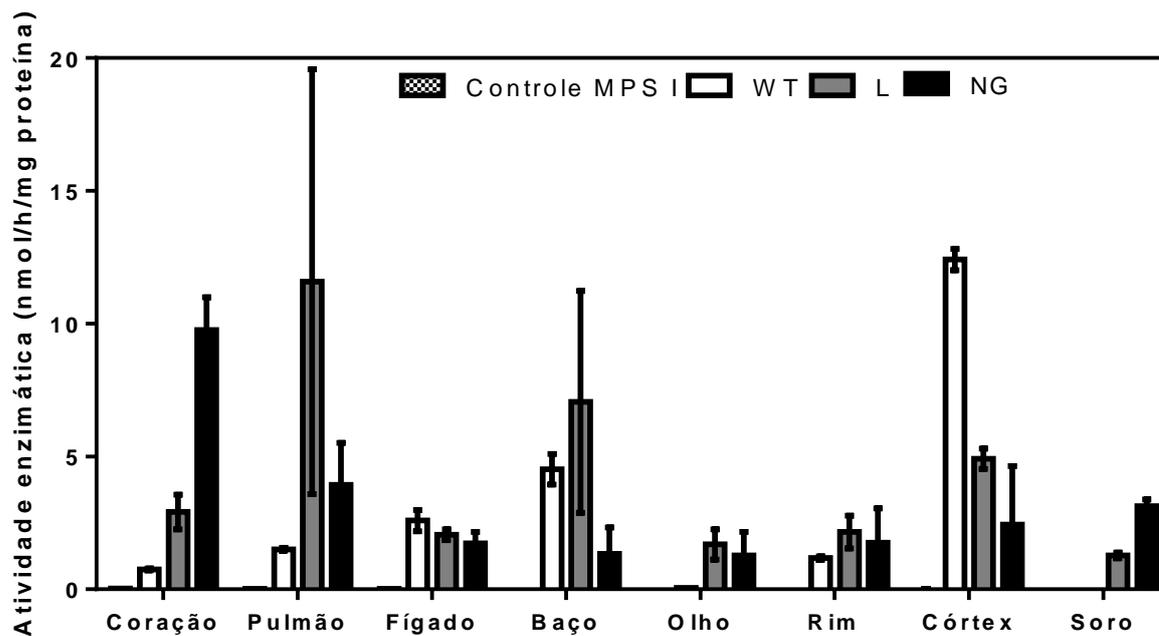


Figura 2. Atividade enzimática de laronidase mensurada nos principais tecidos após administração nasal de camundongos MPS I com L ou NG. MPS I: mucopolissacaridose tipo I; Controle MPS I: grupo controle não-tratado; WT: grupo controle normal *wild type* não-tratado; L: lipossoma contendo laronidase associada; NG: nanoemulsão contendo genisteína e laronidase associadas.

Figura 2

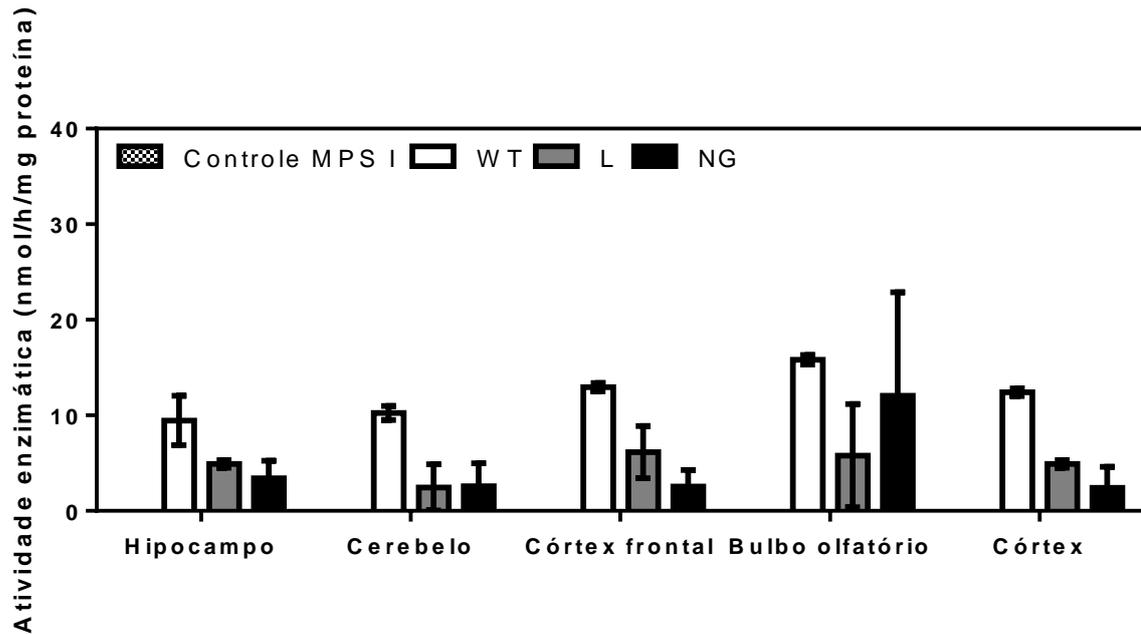


Figura 3. Atividade enzimática de laronidase mensurada nos tecidos cerebrais após administração nasal de camundongos MPS I com L ou NG. MPS I: mucopolissacaridose tipo I; MPS I: grupo controle MPS I não-tratado; WT: grupo controle normal *wild type* não-tratado; L: lipossoma contendo laronidase associada; NG: nanoemulsão contendo genisteína e laronidase associadas.

Figura 3

Resumo**COMPOSIÇÃO NASAL PARA ENTREGA DE ENZIMA RECOMBINANTE,
PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA**

A presente invenção descreve a composição de uma formulação contendo a isoflavona genisteína como vetor para a forma recombinante da enzima iduronidase, com tamanho nanométrico ($< 1,0$ micrômetro) a fim de ser administrado *in vivo* para fins de tratamento da mucopolissacaridose tipo I. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia e consiste em formulações que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica e médica.