



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

(21) BR 102017003860-2 A2

(22) Data do Depósito: 23/02/2017

(43) Data da Publicação: 30/10/2018



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

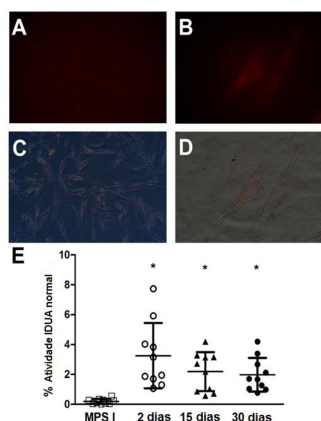
(51) **Int. Cl.:** A61K 48/00; A61K 9/127; C12N 15/88; C12N 9/22

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

(72) **Inventor(es):** ROSELENA SILVESTRI SCHUH; HELDER FERREIRA TEIXEIRA; GUILHERME BALDO; URSULA DA SILVEIRA MATTE; TALITA GIACOMET DE CARVALHO

(85) **Data do Início da Fase Nacional:** 23/02/2017

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO EDITORA DE GENOMA, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA A presente invenção descreve uma composição editora de genoma compreendendo carreadores lipídicos de tamanho nanométrico (1,0 micrômetro) complexados com ao menos um ácido nucleico para ser administrada a células in vitro, ou após a remoção de células para modificação ex vivo, ou administrados in vivo inclusive via injeção hidrodinâmica, para fins de edição de genoma, e ainda os processos de obtenção de tal composição. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia e consiste em formulações que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica e médica.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSIÇÃO EDITORA DE GENOMA, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve composição editora de genoma compreendendo carreadores lipídicos de tamanho nanométrico (< 1,0 micrômetro) complexados com ao menos um ácido nucleico para serem administrados *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* para fins de edição de genoma, e ainda os processos de obtenção de tais carreadores. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia e consiste em formulações aquosas que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica e médica.

Antecedentes da Invenção

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

[0003] Entretanto, apesar de promissora, a terapia gênica enfrenta diversas limitações relacionadas à capacidade de penetração e estabilidade intracelular dos ácidos nucleicos, devido a seu caráter altamente polianiónico, à possibilidade de interação e agregação com proteínas, e à ocorrência de

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

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

[0005] A transfecção mediante o uso de vetores não-virais pode ocorrer através de estruturas poliméricas ou lipídicas, sendo as últimas mais clássicas e mais seguras no que se refere à toxicidade, à biocompatibilidade e biodegradabilidade dos biomateriais utilizados. Entre os vetores baseados em lipídeos catiônicos, os mais descritos na literatura são lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados. Os lipossomas catiônicos (NORDLING-DAVID, M. M.; GOLOMB, G. Gene Delivery by Liposomes. *Israel Journal of Chemistry* 2013, v. 53, n. 9–10, SI, p. 737–747) e as nanoemulsões catiônicas (BRUXEL, F. et al. Investigation of the structural organization of cationic nanoemulsion/antisense oligonucleotide complexes. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2013, v. 112,

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

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

2015, v. 209, p. 37–46).

[0007] Contudo, uma limitação da terapia gênica não-viral é a duração curta da expressão gênica após a liberação intracelular do material genético. A expressão estável de sequências de DNA exógenas pode aumentar consideravelmente se ocorrer sua integração no genoma da célula hospedeira. Entretanto, a integração raramente ocorre e, a fim de superar essa limitação, vários sistemas que promovem a integração dos genes terapêuticos ao genoma têm sido desenvolvidos.

[0008] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0009] A incorporação da proteína Cas9 a lipossomas foi realizada por Liang et al. (2015) com a utilização de um reagente de lipofecção comercial (LIANG, X., et al.; “Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection”. *Journal of Biotechnology*, 2015, v. 208, p. 44-53).

[0010] Foi relatada a utilização da injeção hidrodinâmica para realizar a edição de genoma pela Cas9 no fígado de camundongos (Xue, W., et al.; “CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver”. *Nature* 2014, v.514, p. 380-4. / Yin, H., et al.; “Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype”. *Nature Biotechnology* 2014, v. 32(6), p.551-3.).

[0011] Foi descrita a utilização de estruturas poliméricas chamadas de “nanoclews”, que são gaiolas de DNA formadas por uma fita simples enrolada com firmeza parcialmente complementar ao RNA guia do CRISPR para entregar o sistema CRISPR/Cas9 em células. Esses “nanoclews” foram recobertos por polietileneimina para entrega do sistema CRISPR/Cas9 (Sun, W., et al.; “Efficient Delivery of CRISPR-Cas9 for Genome Editing via Self-Assembled DNA Nanoclews”. *Angewandte Chemie* 2015; v. 54(41), p. 12029-33).

[0012] A tecnologia protegida pelo número WO9712051 (A), 03/04/1997, descreve uma composição farmacêutica útil para a transfecção de ao menos um

ácido nucleico contendo ao menos um agente de transfecção e ao menos um composto pertencente à família das proteínas 3-hidroxi-3-methyl-glutaril (HMG) ou um de seus derivados. Os compostos descritos no documento compreendem um composto da família HMG, que modifica o carreador e difere da presente invenção. O documento não cita a utilização dos compostos para fins de edição de genoma.

[0013] A tecnologia protegida pelo pedido WO2015089462 (A1), 18/06/2015, descreve a utilização de lipossomas como vetores do sistema CRISPR/Cas9, porém difere da presente invenção, pois os lipossomas são produzidos por um método de extrusão através de membrana ou formação espontânea pela hidratação do filme lipídico (Coelho et al, N Engl J Med 2013, v. 369, p. 819-29; Basha et al, Molecular Therapy 2011, v. 19(12), p. 1286-00; Morrissey et al, Nature Biotechnology 2005, v. 23(8), p. 1002-07; Zimnerrnan et al, Nature Letters 2006, v. 441(4), p. 111-14; Geisbert et al, Lancet 2010, v. 375, p. 1896-905; Semple et al, Nature Nanotechnology 2010, v. 28(2), p. 172-177; Jayararnan A., Chem. Int. Ed. 2012, v. 51 , p. 8529-33; U.S. Pat. Nos. 5593972, 5589466 e 5580859). A tecnologia protegida também cita nanoplexos (Bartlett et al, PNAS 2007, v. 104(39), p. 15549-54) e um sistema de entrega baseado em nanopartículas (Davis et al, Nature 2010, v. 464(15), p. 1067-70), que utilizam ciclodextrinas em sua composição, diferindo da presente invenção. As nanopartículas citadas contém polímeros, diferindo da presente invenção.

[0014] A tecnologia protegida pelo número WO2015126502 (A2), 27/08/2015, descreve a incorporação de diversos oligonucleotídeos modificados com tocoferol a lipossomas compostos por apenas dois lipídeos.

[0015] As tecnologias protegidas pelos números WO 2015089419 (A2) 18/06/2015, e WO2014093622 (A2) 19/06/2014, descrevem a utilização de partículas para entrega do sistema CRISPR/Cas. Os lipossomas das tecnologias protegidas são produzidos por um método de extrusão através de membrana ou formação espontânea pela hidratação do filme lipídico (Coelho et al, N Engl J Med 2013, v. 369, p. 819-29; Basha et al, Molecular Therapy 2011, v. 19(12), p.

1286-00; Morrissey et al, Nature Biotechnology 2005, v. 23(8), p. 1002-07; Zimrnerman et al, Nature Letters 2006, v. 441(4), p. 111-14; Geisbert et al, Lancet 2010, v. 375, p. 1896-905; Semple et al, Nature Nanotechnology 2010, v. 28(2), p. 172-177; Jayaraman A., Chem. Int. Ed. 2012, v. 51 , p. 8529-33; U.S. Pat. Nos. 5593972, 5589466 e 5580859). A tecnologia protegida também cita nanoplexos (Bartlett et al, PNAS 2007, v. 104(39), p. 15549-54) e um sistema de entrega baseado em nanopartículas (Davis et al, Nature 2010, v. 464(15), p. 1067-70), que utilizam ciclodextrinas em sua composição, diferindo da presente invenção. As nanopartículas citadas contém polímeros, diferindo da presente invenção.

[0016] A tecnologia protegida pelo número WO 2016161260 (A1) 06/10/2016, descreve métodos e composições que removem o material genético alvo proveniente de uma infecção viral através da administração hidrodinâmica da Cas9, incluindo a injeção de nanopartículas como lipossomas e polímeros catiônicos.

[0017] A tecnologia protegida sob o número WO2015191693 (A2) 17/12/2015, propõe a utilização de dois vetores diferentes, sendo que um carrega o RNA guia e outro o sistema de edição de genoma, além de lipossomas e nanopartículas poliméricas produzidas por métodos diferentes dos mencionados na presente invenção.

[0018] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0019] Dessa forma, a presente invenção difere do estado da técnica, compreendendo a utilização de quatro diferentes tipos de carreadores lipídicos nanométricos aquosos, produzidos por métodos distintos dos mencionados no estado da técnica, contendo o sistema de edição de genoma e o vetor doador

complexados na mesma formulação, para utilização *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* para fins de edição de genoma.

[0020] Os lipossomas produzidos possuem características diferentes do apresentado no estado da técnica, sendo mais estáveis, pois passam por dois métodos de preparo, homogeneização a alta pressão ou microfluidização seguida de extrusão através de membrana.

[0021] A presente invenção também apresenta a incorporação de um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 juntamente com outro ácido nucleico.

[0022] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma composição editora de genoma por compreendendo ao menos um ácido nucleico adsorvido ou encapsulado e carreadores lipídicos, com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,001 a 1,0 micrômetro.

[0023] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição editora de genoma, onde a obtenção de carreadores lipídicos compreendem 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 12 a 72 horas em uma temperatura entre 2°C e 20°C;

(f) sonicar a formulação obtida na etapa (e) por 5 a 60 minutos a uma temperatura entre 25°C e 50°C; e

(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.

[0024] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um processo

de obtenção de composição editora de genoma para obtenção de nanoestruturas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os ácidos nucleicos adsorvidos, compreendendo as etapas de:

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

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

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

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

(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.

[0025] - ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

[0026] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso da composição editora de genoma no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por deficiências ou anomalias cromossômicas.

[0027] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados uma composição editora de genoma, compreendendo carreadores lipídicos de tamanho manométrico e ao menos um ácido nucleico adsorvido ou encapsulado com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,001 a 1,0 micrômetro.

[0028] 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

[0029] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras:

[0030] A figura 1 demonstra a co-complexação das formulações com um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e um plasmídeo doador da sequência da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA) utilizado para reparação do genoma por recombinação homóloga após clivagem pela Cas9, direcionado ao locus Rosa 26 de camundongos. Podem ser observadas bandas dos plasmídeos nus, e pode-se observar que as formulações nanoemulsão com ácidos nucleicos adsorvidos (NA), nanoemulsão com ácidos nucleicos encapsulados (NE) e lipossomas com ácidos nucleicos adsorvidos (LA) complexaram os plasmídeos que não migraram no gel, demonstrando 100% de complexação pois permaneceram no ponto de aplicação. A taxa de 100% foi calculada através do software ImageJ®.

[0031] A figura 2 mostra a eficiência de transfecção: ensaio de captação celular e atividade de IDUA. (A) Ensaio de captação celular com lipossoma marcado com Vermelho do Nilo (20x). (B) Fibroblastos em detalhe (40x). (C) Um canal separado foi gravado utilizando contraste de interferência diferencial e sobreposto no canal de fluorescência para identificar limites celulares e características estruturais comuns, tais como o núcleo (20x). (D) Fibroblastos em detalhe (40x). (E) Atividade de IDUA versus tempo de cultura. Fibroblastos MPS I não tratados (quadrados vazios), fibroblastos MPS I tratados com LA cultivados durante 2 dias (círculos vazios), 15 dias (triângulos cheios) e 30 dias (círculos cheios). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de dez experimentos; * $p < 0,05$, em comparação com os fibroblastos MPS I não tratados no mesmo tempo de cultura (teste de Kruskal-Wallis seguido por Dunns post hoc).

[0032] A figura 3 mostra os valores da atividade enzimática de IDUA murina encontrada no soro de camundongos MPS I não tratados e em camundongos MPS I tratados com o complexo LA CRISPR/pROSA26. Valores

relativos à atividade enzimática de camundongos normais.

Descrição Detalhada da Invenção

[0033] A tecnologia de edição de genoma possibilita a modificação de sequências específicas do genoma através do reconhecimento da região que se deseja alterar e da utilização de nucleases capazes de clivar no local alvo. A manipulação genômica tem gerado expectativas, pois torna possível visar qualquer gene alvo, e assim aumenta as chances de tratamento para doenças genéticas. Para isso, são utilizados sistemas compostos por um domínio de reconhecimento e ligação a sequências específicas do DNA genômico unido a um domínio de clivagem da sequência alvo no DNA (COX, D. B. T.; PLATT, R.J.; ZHANG, F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. Nature Medicine 2015, v. 21, n. 2, p. 121–131).

[0034] As plataformas de edição de genoma são baseadas em proteínas nucleases direcionadas para clivagem de sítios alvo no genoma. A nuclease pode ser uma nuclease efetora tipo ativadora de transcrição (TALEN), uma nuclease dedo de zinco (ZFN), uma meganuclease ou uma nuclease associada a CRISPR (Cas). Em algumas concretizações essas nucleases são entregues em forma de sequências de ácidos nucleicos (plasmídeos ou oligonucleotídeos) codificantes para essas proteínas. Em algumas concretizações, a proteína é uma nuclease associada a CRISPR e é fornecida como parte de uma ribonucleoproteína (RNP) que inclui uma proteína Cas9 recombinante combinada com RNA guia (gRNA), que guia a nuclease até o sítio alvo de clivagem no genoma.

[0035] Entretanto, a fim de aumentar a penetrabilidade intracelular dos carreadores lipídicos contendo ao menos um ácido nucleico para edição de genoma, a utilização da injeção hidrodinâmica se torna interessante. A entrega hidrodinâmica envolve a liberação da nuclease (na forma de um ou de uma combinação de ácidos nucleicos, proteínas e RNP) complexada com nanoestruturas lipídicas diretamente nos vasos sanguíneos de um sujeito sob pressão hidrodinâmica, que ajuda a permeabilizar o endotélio vascular e a

membrana plasmática das células circundantes, promovendo a penetração intracelular do ácido nucleico, proteína e/ou RNP.

[0036] Desta forma, a invenção proporciona métodos e composições que editam o material genético alvo de um indivíduo por administração hidrodinâmica de carreadores lipídicos contendo uma nuclease ou uma sequência de ácido nucleico que codifica uma nuclease que cliva o material genético alvo.

[0037] Em algumas concretizações, a invenção proporciona métodos e composições que editam o material genético alvo de um indivíduo através da administração *in vivo* de carreadores lipídicos contendo uma nuclease ou uma sequência de ácido nucleico que codifica uma nuclease que cliva o material genético alvo.

[0038] Em algumas concretizações, a invenção proporciona métodos e composições que editam o material genético alvo de uma célula através da administração *in vitro* de carreadores lipídicos contendo uma nuclease ou uma sequência de ácido nucleico que codifica uma nuclease que cliva o material genético alvo.

[0039] Em algumas concretizações, a invenção inclui a obtenção de uma célula ou população de células de um sujeito e a edição do material genético alvo *ex vivo* através de carreadores lipídicos contendo uma nuclease ou uma sequência de ácido nucleico que codifica uma nuclease que cliva o material genético alvo. Em algumas realizações, ocorre posterior reintrodução das células modificadas *ex vivo* no sujeito. As células podem ser expandidas *in vitro* antes da reintrodução no sujeito. Em algumas concretizações, as células podem ser células tronco ou precursoras de linhagens celulares.

[0040] O ácido nucleico pode ser o DNA de um vetor plasmideal, o RNA mensageiro (mRNA) ou o gRNA que codifica uma enzima ou faz parte da enzima que atuará clivando o material genético alvo, ou ainda pode ser uma sequência modelo utilizada para reparação do genoma alvo por recombinação homóloga. Onde o alvo no genoma inclui qualquer sequência que possa ser modificada para promover o silenciamento, a expressão ou superexpressão de proteínas,

incluindo sequências de DNA viral. Em concretizações preferenciais, o ácido nucleico estará complexado a um carreador lipídico que será administrado *in vivo* inclusive por via hidrodinâmica.

[0041] A nuclease segmentável pode ser uma nuclease efetora tipo ativadora de transcrição (TALEN), uma nuclease de dedo de zinco (ZFN), uma meganuclease ou uma nuclease associada a CRISPR (Cas). Em algumas concretizações, a nuclease segmentável é uma nuclease associada a CRISPR e é fornecida como parte de uma RNP que inclui uma proteína Cas9 recombinante combinada com o gRNA. Em concretizações preferenciais, a nuclease segmentável está complexada a um carreador lipídico que será administrado *in vivo*, inclusive por via hidrodinâmica.

[0042] Face ao exposto, considerando a baixa penetrabilidade intracelular dos ácidos nucleicos nus, juntamente com as vantagens do uso de sistemas nanométricos no carregamento e administração de ácidos nucleicos, juntamente com as potencialidades biológicas da administração de plataformas de edição de genoma, a presente invenção refere-se a formulações aquosas compreendendo ao menos um ácido nucleico complexado a carreadores lipídicos de diâmetro médio de gotícula/partícula inferior a 1,0 micrômetro. Os nanocarreadores lipídicos da presente invenção compreendem nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.

[0043] O processo de fabricação dos produtos compreende uma etapa de homogeneização a alta pressão ou microfluidização, a fim de produzir carreadores lipídicos nanométricos de tamanhos uniformes e com alta estabilidade. Além disso, o processo de fabricação das nanoemulsões pode compreender uma etapa de pré-complexação com os ácidos nucleicos, que confere maior proteção contra degradação. Já o processo de fabricação dos lipossomas passa por uma etapa adicional de extrusão manual que confere alta estabilidade aos produtos. Os carreadores contendo ao menos um ácido nucleico para edição de genoma podem ser utilizados *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

[0044] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma

composição editora de genoma por compreendendo ao menos um ácido nucleico adsorvido ou encapsulado e carreadores lipídicos, com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,001 a 1,0 micrômetro.

[0045] Em uma concretização, os ácidos nucleicos são um ou mais selecionados do grupo que consiste em: sequência de RNA guia, sequência codificadora de nuclease, sequência de DNA modelo para recombinação homóloga ou sequência inteira de um gene.

[0046] Em uma concretização, a composição editora de genoma compreende uma nuclease.

[0047] Em uma concretização, a nuclease é a Cas9.

[0048] Em uma concretização, as nanoestruturas são nanoemulsões com ácidos nucleicos encapsulados, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados.

[0049] Em uma concretização, a composição editora de genoma compreende excipientes farmacologicamente adequados.

[0050] Em uma concretização, a composição editora de genoma compreende excipientes farmacologicamente adequados.

[0051] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição editora de genoma, onde a obtenção de carreadores lipídicos compreendem 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 12 a 72 horas em uma temperatura entre 2°C e 20°C;

(f) sonificar a formulação obtida na etapa (e) por 5 a 60 minutos a uma

temperatura entre 25°C e 50°C; e

(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.

[0052] Em uma concretização, a solução orgânica descrita na etapa (a) é um solvente orgânico apolar.

[0053] Em uma concretização, caso o produto a ser obtido seja o lipossoma, o processo compreende 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.

[0054] 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.

[0055] Em uma concretização, para a obtenção de nanoemulsões contendo os ácidos nucleicos encapsulados, a solução orgânica descrita na etapa (a) é a fase orgânica do pré-complexo obtido através das etapas:

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

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

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

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

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

[0056] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de composição editora de genoma para obtenção de nanoestruturas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os ácidos nucleicos adsorvidos, compreendendo as etapas de:

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

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

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

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

(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.

[0057] 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.

[0058] Em uma concretização, o solvente orgânico polar prótico é metanol, e o solvente orgânico apolar ser clorofórmio.

[0059] Em uma concretização, a fase lipídica é escolhida do grupo que compreende:

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

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

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

dos mesmos;

- d) lipídeos neutros;
- e) lipídeos catiônicos; e
- f) lipídios com ramificação de PEG (peguilados).

[0060] Em uma concretização, o agente de tonicidade ser escolhido do grupo que compreende sorbitol, etilenoglicol, polietilenoglicol, manitol, glicerol, e/ou mistura destes.

[0061] 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);

e

fase aquosa:

- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p)
- ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

[0062] 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);

e

fase aquosa:

- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p)
- ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

[0063] 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); e
- ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

[0064] 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:

- 1,0% p/p Polissorbato 80 (1,0% p/p a 5,0% p/p);
- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p); e
- ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

[0065] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso da composição editora de genoma no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por deficiências ou anomalias cromossômicas.

[0066] Em uma concretização, o uso da composição editora de genoma é no preparo de um medicamento para o tratamento das mucopolissacaridoses.

[0067] Em uma concretização, o uso da composição editora de genoma é na administração ser em células in vitro, ou após a remoção de células para modificação ex vivo, ou in vivo, inclusive por injeção hidrodinâmica.

[0068] A presente invenção apresenta como vantagens uma maior penetrabilidade intracelular devido ao uso de sistemas nanométricos no carregamento e administração de ácidos nucleicos possibilitando a edição genoma, que com o uso de nucleases e ácidos nucleicos guia, possibilita uma especificidade na edição. Também é uma vantagem a possibilidade de

tratamento de doenças que possam ser causadas por problemas genômicos utilizando os produtos da presente invenção.

Exemplos - Concretizações

[0069] 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

[0070] O sistema para edição de genoma deve conter ao menos um ácido nucleico, seja ele uma sequência de RNA guia, um plasmídeo ou oligonucleotídeo contendo a sequência codificadora para a proteína Cas, uma sequência de DNA doadora para recombinação homóloga ou ainda uma sequência inteira de um gene. A nuclease proteica pode fazer parte do sistema de edição de genoma.

[0071] Nas composições da presente invenção, o ácido nucleico pode ser tanto um ácido desoxirribonucleico, como um ácido ribonucleico. Pode tratar-se de sequências de origem natural ou artificial.

[0072] Com relação mais particularmente aos ácidos desoxirribonucleicos, eles podem ser de fita simples ou dupla. Esses ácidos desoxirribonucleicos podem codificar para enzimas, RNAm ou ainda sequências parciais ou inteiras genes terapêuticos. Pode ser, ainda, DNA proveniente de vírus.

[0073] No sentido da invenção, entende-se por gene terapêutico notadamente qualquer gene codificando para um produto proteico tendo um efeito terapêutico. O produto proteico assim codificado pode ser uma proteína, um peptídeo, etc. Este produto proteico pode ser homólogo com relação à célula alvo (isto é, um produto que é normalmente expresso na célula alvo, quando esta não apresenta nenhuma patologia). Nesse caso, a expressão de uma proteína permite por exemplo paliar uma expressão insuficiente na célula, ou a expressão de uma proteína inativa ou fracamente ativa em razão de uma

modificação, ou ainda superexpressar a referida proteína. O gene terapêutico pode ainda codificar para uma proteína celular mutante, tendo uma estabilidade aumentada, uma atividade modificada, etc. O produto proteico pode igualmente ser heterólogo com relação à célula alvo. Neste caso, uma proteína expressada pode por exemplo completar ou promover uma atividade deficiente para a célula, permitindo-lhe lutar contra uma patologia, ou estimular uma resposta imune.

Fase lipídica

[0074] A fase lipídica adequada para a presente invenção é constituída por tensoativos lipofílicos, óleos, lipídeos sólidos e líquidos e/ou mistura desses.

[0075] 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).

[0076] 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.

[0077] 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.

[0078] Os lipídios podem ser peguizados, isto é, possuindo uma ramificação de polietilenoglicol (PEG) em sua cadeia, como DSPE-PEG, DMPE-PEG, colesterol-PEG, DPPE-PEG (dipalmitoilglicerofosfoetanolamina-polietilenoglicol), DLPE-PEG (dilauroilglicerofosfoetanolamina-polietilenoglicol), entre outros.

[0079] 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.

[0080] Para se obter um efeito ótimo das composições da invenção, as proporções respectivas de ácido nucleico e de lipídio catiônico são, de preferência, determinadas de maneira que a relação cargas positivas do agente de transfecção/cargas negativas dos ácidos nucleicos seja compreendida entre 0,1 e 15 e, com maior preferência, entre 2 e 8. Essa relação de cargas pode contabilizar ou não outros lipídios carregados positivamente ou negativamente na formulação.

[0081] 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 esfingolípídios (tais como notadamente as esfingomielinas), ou ainda os asialogangliosídeos (tais como notadamente os asialoGM1 e Glv12).

[0082] 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.

[0083] No caso em que o agente de transfecção é um lipídio catiônico, as composições da invenção compreendem, além do lipídio catiônico nas relações citadas acima, de 0,1 a 20 equivalentes molares de lipídio neutro para 1 equivalente molar de fosfato do ácido nucleico, e, com maior preferência, de 2 a 8.

[0084] 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).

[0085] 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).

[0086] 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).

[0087] 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

[0088] 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

[0089] 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.

[0090] 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).

Solventes orgânicos

[0091] 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.

[0092] 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

[0093] 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 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.

[0094] 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 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;
- 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.

[0095] É um objeto adicional da presente invenção os processos de obtenção das nanoemulsões que terão os ácidos nucleicos encapsulados, com

as etapas de:

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

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

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

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

e) evaporar o solvente orgânico para formar um filme;

f) adicionar a fase aquosa;

g) deixar por 12 a 72 horas em 2°C a 20°C;

e) sonicar 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.

[0096] O processo de obtenção das nanoestruturas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os ácidos nucleicos adsorvidos, compreende as etapas de:

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

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

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

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

segundos a 5 minutos;

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

Formulações compreendendo os carreadores lipídicos

[0097] Os produtos da presente invenção são formulações que compreendem as nanoestruturas lipídicas, associadas a excipientes adequados, úteis nas áreas farmacêutica e médica.

[0098] Os carreadores da presente invenção podem estar sob a forma de nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.

Especificação das nanopartículas lipídicas

[0099] 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.

[0100] Determinação do diâmetro de gotícula/partícula e do índice de polidispersão (IPD):

[0101] 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

[0102] O potencial zeta foi determinado através da mobilidade eletroforética das gotículas/vesículas. As medidas foram realizadas após calibração com uma solução padrão a -55 mV (látex poliestireno carboxilato). Todas as análises foram realizadas após a diluição das amostras em água purificada, previamente filtrada em membrana nylon de 0,22 µm. Os resultados

foram expressos como média de três determinações independentes.

Taxa de complexação com os ácidos nucleicos

[0103] A complexação dos ácidos nucleicos com as formulações foi verificada através de eletroforese em gel de agarose. Os complexos foram avaliados na relação de cargas +4/ -1 (cargas do lipídio catiônico/cargas dos ácidos nucleicos) e foram sujeitos à eletroforese em gel de agarose 1 % corados com o corante SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A estabilidade dos complexos das nanoestruturas catiônicas/DNA foi determinada utilizando um ensaio de digestão com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, EUA). As bandas foram analisadas e sua intensidade foi calculada através do software ImageJ[®], gerando a taxa de complexação em porcentagem.

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

Composição final:

[0104] Fase lipídica

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

[0105] Fase aquosa

- a. 2,25% p/p Glicerol
- b. ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

Procedimento:

[0106] Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados e dissolvidos em clorofórmio, com agitação constante. Os componentes da fase aquosa foram pesados e dissolvidos em água purificada, com agitação constante. A fase orgânica foi rota evaporada a pressão normal e temperatura ambiente, para eliminação do solvente orgânico e até a secura total, para formação do filme lipídico. Ao final do processo, a fase aquosa foi vertida sobre

o filme lipídico, que foi mantido a 4°C durante 12 horas. Após, a formulação foi sonicada a 37°C durante 15 minutos. Após, então, a formulação foi homogeneizada em homogeneizador a alta pressão por 10 ciclos de 500 bar cada, a fim de manter o diâmetro de gotícula da fase oleosa o menor possível e com menor índice de polidispersão. Por fim, os ácidos nucleicos foram adicionados à formulação.

Produto obtido: Nanoemulsão (NA).

Resultados:

- Tamanho: 158 nm
- IPD: 0,12
- Potencial zeta: +40,1 mV
- Taxa de complexação: 100%. Ver figura 1.

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

Composição:

[0107] Fase lipídica

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

[0108] Fase aquosa

- a. 2,25% p/p Glicerol
- b. ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

Procedimento:

[0109] Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados. O complexo hidrofóbico DNA/DOTAP foi preparado através da incubação dos ácidos nucleicos com o lipídio catiônico DOTAP numa mistura monofásica de clorofórmio:metanol:água (1:2,1:1) em temperatura ambiente durante 30 min. A monofase foi, então, dividida em duas fases pela adição de clorofórmio e água

(2 mL de cada), seguido por vórtex breve. As fases aquosa superior e orgânica inferior foram separadas por centrifugação a 2000 x g durante 10 min em temperatura ambiente. Na fase orgânica, então, os demais lipídios foram dissolvidos. Os componentes da fase aquosa foram pesados e dissolvidos em água purificada, sob agitação constante. A fase orgânica foi rota evaporada a pressão normal em temperatura ambiente, para eliminação do solvente orgânico e até a secura total, para formação do filme lipídico. Ao final do processo, a fase aquosa foi vertida sobre o filme lipídico, que é mantido a 4°C durante 12 horas. Após, a formulação foi sonicada a 37°C durante 15 minutos. Após, então, a formulação foi homogeneizada em homogeneizador a alta pressão por 10 ciclos de 500 bar cada, a fim de manter o diâmetro de gotícula da fase oleosa o menor possível e com menor índice de polidispersão.

Produto obtido: Nanoemulsão (NE).

Resultados:

- Tamanho: 158 nm
- IPD: 0,12
- Potencial zeta: +42,2 mV
- Taxa de complexação: 100%. Ver figura 1.

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

Composição:

[0110] Fase lipídica

- a. 0,56% p/p DOPE
- b. 0,56% p/p DOTAP
- c. 0,285% p/p DSPE-PEG

[0111] Fase aquosa

- a. 2,25% p/p Glicerol
- b. ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

Procedimento:

[0112] Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados e dissolvidos em clorofórmio, com agitação constante. Os componentes da fase aquosa foram pesados e dissolvidos em água purificada, com agitação constante. A fase orgânica foi rota evaporada a pressão normal e temperatura ambiente, para eliminação do solvente orgânico e até a secura total, para formação do filme lipídico. Ao final do processo, a fase aquosa é vertida sobre o filme lipídico, que é mantido a 4°C durante 12 horas. Após, a formulação é sonicada a 37°C durante 15 minutos. Após, então, a formulação é homogeneizada em homogeneizador a alta pressão por 10 ciclos de 500 bar cada, a fim de manter o diâmetro de gotícula da fase oleosa o menor possível e com menor índice de polidispersão. Por fim, os ácidos nucleicos foram adicionados à formulação.

Produto obtido: Lipossoma (LA).

Resultados:

-Tamanho: 98 nm

-IPD: 0,18

-Potencial zeta: +42,8 mV

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

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

Composição:

[0113] Fase orgânica

- a. 1,4% p/p Monoestearato de glicerila
- b. 0,6% p/p DOTAP

[0114] Fase aquosa

- a. 1,0% p/p Polissorbato 80
- b. 2,25% p/p Glicerol
- c. ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

Procedimento:

[0115] 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.

Produto obtido: Nanopartícula lipídica sólida.

Resultados:

- Tamanho: 396 nm
- IPD: 0,60
- Potencial zeta: -22,20 mV
- Taxa de complexação: 100%.

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

Composição:

[0116] Fase orgânica

- a. 1,0% p/p Monoestearato de glicerila
- b. 0,5% p/p DOTAP
- c. 0,5% p/p Triglicerídeos de cadeia média

[0117] Fase aquosa

- a. 1,0% p/p Polissorbato 80
- b. 2,25% p/p Glicerol
- c. ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

Procedimento:

[0118] 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.

Produto obtido: Carreador lipídico nanoestruturado.

Resultados:

- Tamanho: 220 nm
- IPD: 0,451
- Potencial zeta: -13,36 mV
- Taxa de complexação: 100%.

Administração hidrodinâmica

[0119] Para a entrega dos carreadores lipídicos contendo ao menos um ácido nucleico para fins de edição de genoma, a invenção inclui a obtenção de uma célula ou população de células de um sujeito e a edição do material genético alvo *ex vivo* através de carreadores lipídicos contendo uma nuclease ou uma sequência de ácido nucleico que codifica uma nuclease que cliva o material genético alvo. Em algumas realizações, ocorre posterior reintrodução das células modificadas *ex vivo* no sujeito. Em algumas concretizações, as células podem ser células tronco ou precursoras de linhagens celulares.

[0120] Para a entrega dos carreadores lipídicos contendo ao menos um ácido nucleico para fins de edição de genoma, a invenção proporciona a

administração a células *in vitro*. Em algumas concretizações, as células podem ser células tronco ou precursoras de linhagens celulares.

[0121] Para a entrega dos carreadores lipídicos contendo ao menos um ácido nucleico para fins de edição de genoma, a invenção proporciona a administração *in vivo*. Esta administração pode se dar por via intravenosa através de injeção com seringa ou cateter em *bolus* ou através de infusão, por via intramuscular, por administração intranasal, por administração subcutânea ou cutânea, entre outras vias possíveis. As vias não citadas não estão descartadas.

[0122] Para a entrega dos carreadores lipídicos contendo ao menos um ácido nucleico para fins de edição de genoma, a invenção proporciona o uso de injeção hidrodinâmica. Esta tecnologia controla a pressão hidrodinâmica nos capilares para promover a permeabilidade das células endoteliais e parenquimatosas (Suda, T. e Liu, D. Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications, Molecular Therapy 2007, v. 15(12), p. 2063-2069). O primeiro teste clínico hidrodinâmico em seres humanos foi relatado no 9º Encontro Anual da Sociedade Americana de Terapia Genética (Estudo Clínico com Distribuição de Gene Hidrodinâmica em Hepatócitos em Humanos).

[0123] É preferível utilizar um volume de injeção de 10% do peso corporal ou menos para administração hidrodinâmica. Especificamente, cerca de 100 mL de formulação por kg de peso corporal podem ser administrados (i.e., 10% do peso corporal). Mais preferencialmente, o volume de injeção está compreendido entre 0,5 e 10% do peso corporal.

[0124] Para a injeção hidrodinâmica, é fornecida uma solução a uma pressão suficiente para gerar poros nas células próximas ao vaso sanguíneo, ou uma pressão logo abaixo desse limiar. A injeção hidrodinâmica é utilizada para administrar uma nuclease segmentável ou um ácido nucleico tal como um plasmídeo que codifica a nuclease segmentável. Numa concretização preferida, a nuclease segmentável é a Cas9.

[0125] A Cas9 (proteína 9 associada a CRISPR) é uma enzima

endonuclease de DNA guiada por RNA. A Cas9 foi descoberta como parte do sistema imune de *Streptococcus pyogenes*, onde memoriza e mais tarde cliva o DNA estranho ao desenrolá-lo para procurar regiões complementares a uma região espaçadora de 20 pares de bases do RNA guia, onde depois cliva. A cas9 pode ser usada para fazer a dupla vertente dirigida ao local de quebra de DNA, o que pode levar à inativação gênica ou à introdução de genes heterólogos através de união por extremidade não homóloga e recombinação homóloga. Outras ferramentas exemplares para edição de genoma incluem nucleases dedo de zinco (ZNF) e proteínas nucleases efetoras do tipo ativadoras de transcrição (TALEN).

[0126] O método inclui a utilização de um sistema de injeção para gerar pressão hidrodinâmica e entregar a formulação (que inclui a nuclease segmentável) no vaso sanguíneo de um sujeito a uma pressão suficiente para fazer com que a nuclease entre nas células próximas ao vaso sanguíneo. De preferência, os sistemas nanoestruturados contendo ao menos um ácido nucleico da invenção são utilizados para administração hidrodinâmica através de um cateter de administração intravascular (por exemplo, com posicionamento do cateter através de uma veia femoral do sujeito e em uma veia hepática ou através de uma veia jugular do sujeito e em uma artéria hepática), de uma seringa operada manualmente ou com a utilização de bomba de infusão exercendo uma pressão determinada ou com controle da velocidade de infusão. Exemplos de aplicação do produto obtido de acordo com o exemplo 3, acima descrito:

[0127] Os ácidos nucleicos descritos no item d da fase lipídica do exemplo 3, foi DNA na relação de cargas teórica +4/-1, sendo metade composta por um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 com RNA guia para a mutação p.W402X da mucopolissacaridose tipo I (MPS I) e metade composta por um oligonucleotídeo para recombinação homóloga contendo a sequência genômica correta da alfa-L-iduronidase (IDUA).

Construção do plasmídeo CRISPR/Cas9 e do oligonucleotídeo W402X

[0128] Um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para os experimentos de edição genômica. Neste sistema, a nuclease Cas9 e o RNA guia formado por um transcrito crRNA-tracrRNA estão presentes em um único vetor, o sgRNA (single guide RNA). Uma sequência alvo de 20 pb adjacente a uma NGG (sequência PAM) que está a 16 nucleotídeos distante da base mutada na p.W402X foi selecionada. Os oligonucleotídeos senso e anti-senso foram sintetizados e ligados ao vetor que codifica o Cas9. O vetor completo foi inserido por transformação por choque térmico em bactérias competentes TOP 10 (Invitrogen, USA), cujas colônias foram então expandidas e submetidas à extração de plasmídeo com o kit Maxiprep (Life Technologies, EUA). O DNA plasmideal extraído foi então sequenciado para verificação da correta orientação do inserto.

[0129] Para a recombinação direcionada é utilizado um oligonucleotídeo de 134 bases homólogo à região W402X com a base que é alterada nesta mutação substituída pelo nucleotídeo correto (chamado oligonucleotídeo dador).

Transfecção de fibroblastos

[0130] Os fibroblastos de um paciente MPS I (genótipo p.W402X/p.W402X) nas passagens 3-8 foram semeados a 5×10^4 células / poço numa placa de 6 poços e cultivados em DMEM contendo soro fetal bovino a 10% e ampicilina / estreptomicina a 1%. As células foram mantidas em uma incubadora de CO₂ umidificada a 37 °C por 24 horas antes do ensaio, quando adquiriram com 50% - 60% de confluência. A transferência de genes foi realizada incubando as células com os complexos LA durante 48 horas.

Captação celular do lipossoma marcado com Vermelho do Nilo

[0131] O corante Vermelho do Nilo (Thermo Fisher Scientific, EUA) foi dissolvido em clorofórmio com os outros lipídios na proporção de 1 mg / ml de formulação. A preparação da formulação continuou como descrito para o lipossoma branco. O ensaio de captação celular foi realizado após incubação com o lipossoma marcado com Vermelho do Nilo durante 24 h em DMEM isento de soro. A marcação fluorescente foi estudada sob microscópio de

epifluorescência (Olympus-BX 51, Tóquio, Japão), equipado com uma câmera digital usando um objetivo plano-neofluar (Olympus-DP 71, Tóquio, Japão) (20x para imagens de visão geral ou 40x). Ver Figura 2 A-D.

Atividade enzimática de IDUA

[0132] Aos 2 dias, 15 ou 30 dias após a transfecção, 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 e apresentados como percentagem da atividade de IDUA medida em fibroblastos normais. O teor de proteína foi quantificado utilizando o método descrito por Lowry e colaboradores. Ver Figura 2 E.

Ensaio *in vivo*

Modelo murino de MPS I

[0133] 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 da *Idua*. No meio do éxon foi inserido um gene de resistência à neomicina em sentido inverso. Como resultado foram produzidos camundongos com uma doença que mimetiza a Síndrome de Hurler, fenótipo mais grave da MPS I, com aumento do nível de glicosaminoglicanos na urina e em diversos tecidos, e atividade indetectável de *Idua*.

[0134] Todos os procedimentos com animais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e seguem as normas de adequação às diretrizes vigentes previstas na Lei 11.794/08 e nas resoluções normativas números 12 (Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos) e 30 (Diretrizes da

Prática de Eutanásia do CONCEA). Os animais são mantidos em ambiente controlado (temperatura 20-24°C, umidade relativa do ar 40-60% e sistemas de exaustão de ar) com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e alimentação comercial padrão para a espécie e água ad libitum. Todos os animais utilizados foram genotipados por identificação molecular do transgene.

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

[0135] Um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para os experimentos de edição genômica. Neste sistema, a nuclease Cas9 e o RNA guia formado por um transcrito crRNA-tracrRNA estão presentes em um único vetor, o sgRNA (single guide RNA). Uma sequência alvo para clivagem pela Cas9 foi selecionada no locus ROSA26 do genoma de camundongos e foi inserida no vetor. O vetor completo foi inserido por transformação por choque térmico em bactérias competentes TOP 10 (Invitrogen, USA), cujas colônias foram então expandidas e submetidas à extração de plasmídeo com o kit Maxiprep (Life Technologies, EUA). O DNA plasmídeo extraído foi então sequenciado para verificação da correta orientação do inserto.

[0136] Para a recombinação direcionada é utilizado um vetor contendo o cDNA da *Idua*. O construto contém a sequência de cDNA da *Idua* regulada por um promotor e duas regiões homólogas (de aproximadamente 1 kb cada uma) ao locus ROSA26 de camundongos, na região do locus em que a Cas9 reconhece e cliva.

Tratamento

[0137] Um grupo (n=3) foi utilizado para a administração dos complexos LA e recebeu por via hidrodinâmica o complexo LA em uma aplicação. Como controles foram utilizados camundongos normais que não receberam nenhum tratamento (n=3) e camundongos MPS I que não receberam nenhum tratamento (n=3).

[0138] Para a injeção hidrodinâmica na veia temporal superficial, os animais são imobilizados pelo pesquisador e é injetada rapidamente uma dose de 8 – 10 % do peso do animal. Não há repetição de dose.

Dosagem enzimática sérica de *Idua*

[0139] O nível sérico de *Idua* é mensurado nos animais tratados a partir de 30 dias após o tratamento, e após, mensalmente. Os resultados são comparados com animais MPS I não-tratados e animais normais. 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

[0140] 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 editora de genoma **caracterizada** por compreender ao menos um ácido nucleico adsorvido ou encapsulado e carreadores lipídicos, com diâmetro médio de gotícula/partícula compreendido na faixa de 0,001 a 1,0 micrômetro.

2. Composição editora de genoma, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelos ácidos nucleicos serem um ou mais selecionados do grupo que consiste em: sequência de RNA guia, sequência codificadora de nuclease, sequência de DNA modelo para recombinação homóloga ou sequência inteira de um gene.

3. Composição editora de genoma, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por compreender uma nuclease.

4. Composição editora de genoma, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pela nuclease ser a Cas9.

5. Composição editora de genoma, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizada** pelas nanoestruturas serem nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados.

6. Composição editora de genoma, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** por compreender excipientes farmacologicamente adequados.

7. Processo de obtenção de composição editora de genoma conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pela obtenção da composição editora de genoma compreender as etapas de:

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

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

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

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

(e) deixar descansar o produto obtido na etapa (d) por 12 a 72 horas em uma temperatura entre 2°C e 20°C;

(f) sonicar a formulação obtida na etapa (e) por 5 a 60 minutos a uma temperatura entre 25°C e 50°C; e

(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.

8. Processo de obtenção de composição editora de genoma de acordo com a reivindicação 7, caso o produto a ser obtido seja o lipossoma, **caracterizado** por 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.

9. Processo de obtenção de composição editora de genoma, de acordo com a reivindicação 7, **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.

10. Processo de obtenção de composição editora de genoma de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que, para a obtenção de nanoemulsões contendo os ácidos nucleicos encapsulados, a solução orgânica descrita na etapa (a) é a fase orgânica do pré-complexo obtido através das etapas:

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

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

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

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

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

11. Processo de obtenção de composição editora de genoma conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** por, caso o produto a ser obtido seja nanoestruturas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os ácidos nucleicos adsorvidos, compreender as etapas de:

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

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

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

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

(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.

12. Processo de obtenção de composição editora de genoma, de acordo com as reivindicações 7 a 11, **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.

13. Processo de obtenção de composição editora de genoma, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo solvente orgânico polar prótico ser metanol, e o solvente orgânico apolar ser clorofórmio.

14. Processo de obtenção de composição editora de genoma, de acordo com as reivindicações 7 a 11 **caracterizado pela** fase lipídica ser escolhida do grupo que compreende:

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

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

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

d) lipídeos neutros;

e) lipídeos catiônicos; e

f) lipídios com ramificação de PEG (peguilados).

15. Processo de obtenção de composição editora de genoma, de acordo com as reivindicações 7 a 11, **caracterizado** pelo agente de tonicidade ser escolhido do grupo que compreende sorbitol, etilenoglicol, polietilenoglicol, manitol, glicerol, e/ou mistura destes.

16. Processo de obtenção de composição editora de genoma, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 16, **caracterizado** pela fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção dos lipossomas compreenderem:

fase lipídica:

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

e

fase aquosa:

- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p)
- ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

17. Processo de obtenção de composição editora de genoma, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 16, **caracterizado** pela fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção das nanoemulsões compreenderem:

fase lipídica:

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

e

fase aquosa:

- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p)
- ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

18. Processo de obtenção de composição editora de genoma, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 16, **caracterizado** pela fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção das nanopartículas lipídicas sólidas compreenderem:

fase lipídica:

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

fase aquosa:

- 1,0% p/p Polissorbato 80 (1,0% p/p a 5,0% p/p);
- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p); e
- ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO).

19. Processo de obtenção de composição editora de genoma, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 16, **caracterizado** pela fase lipídica e fase aquosa do processo de obtenção dos carreadores lipídicos nanoestruturados compreenderem:

fase lipídica:

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

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

fase aquosa:

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

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

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

20. Uso da composição editora de genoma conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** por ser no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por deficiências ou anomalias cromossômicas.

21. Uso da composição editora de genoma de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** por ser no preparo de um medicamento para o tratamento das mucopolissacaridoses.

22. Uso da composição editora de genoma de acordo com as reivindicações 21 ou 22, **caracterizada** pela administração ser em células *in vitro*, ou após a remoção de células para modificação *ex vivo*, ou *in vivo*, inclusive por injeção hidrodinâmica.

FIGURAS

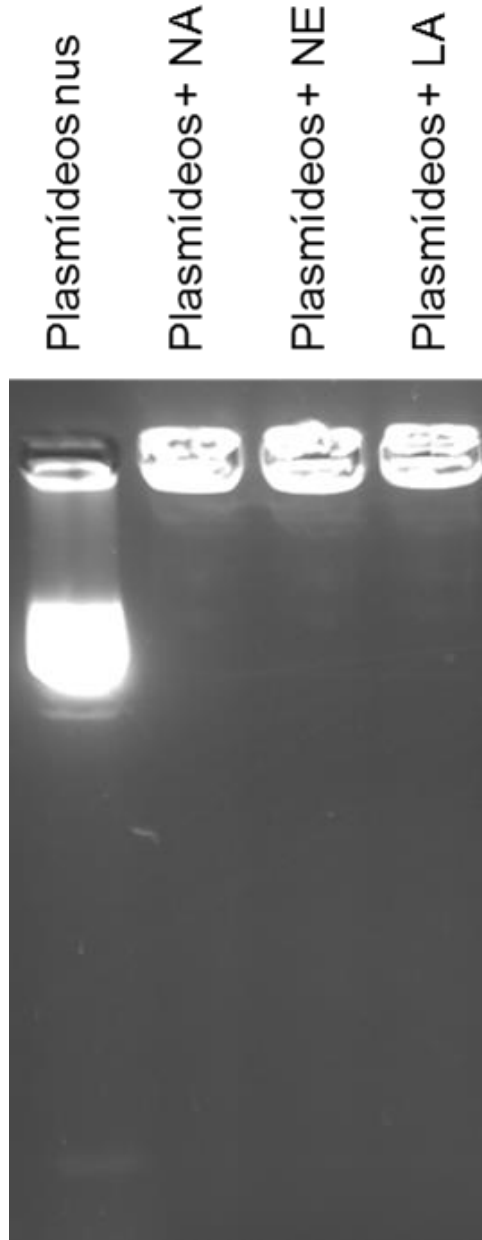


Figura 1

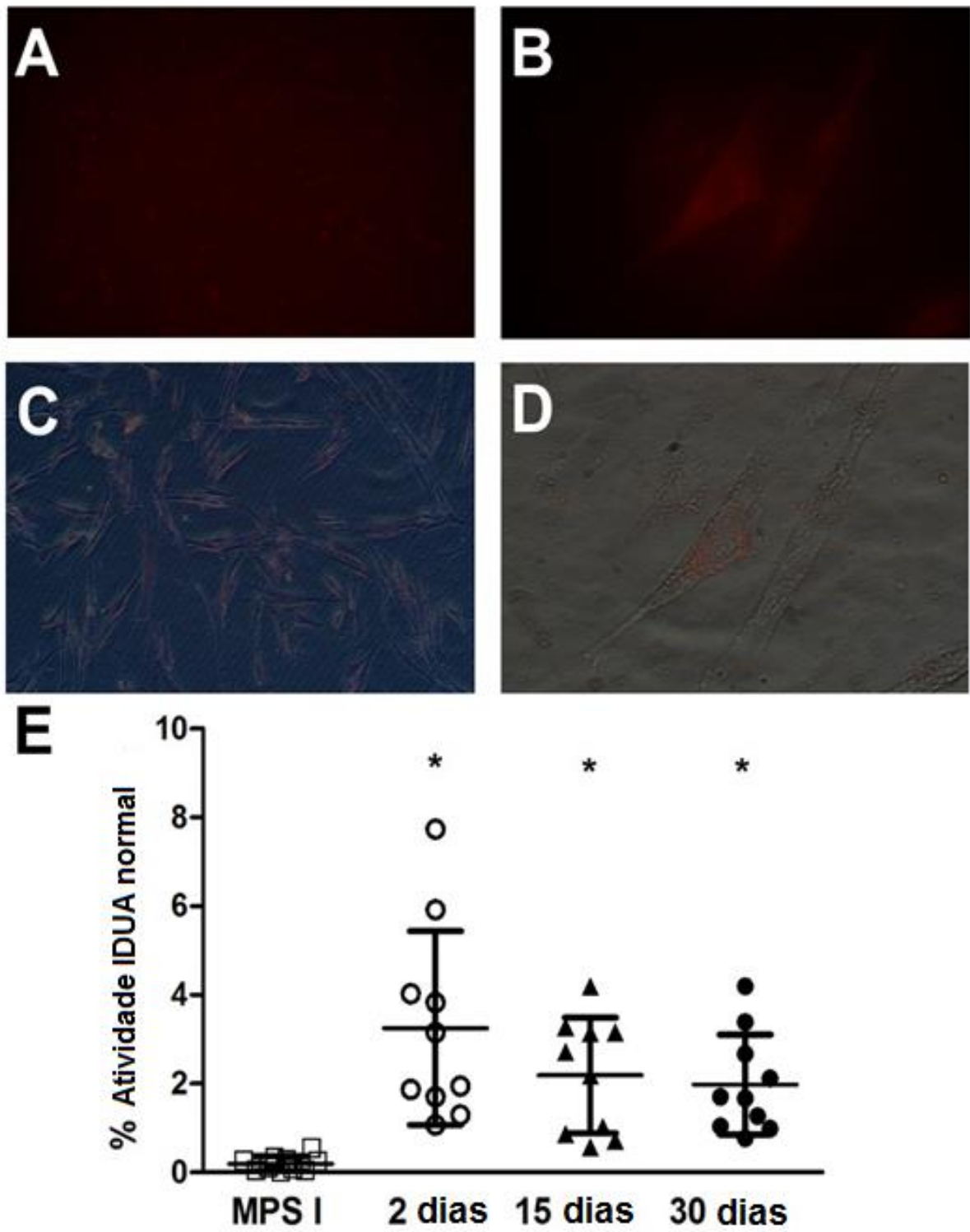


Figura 2

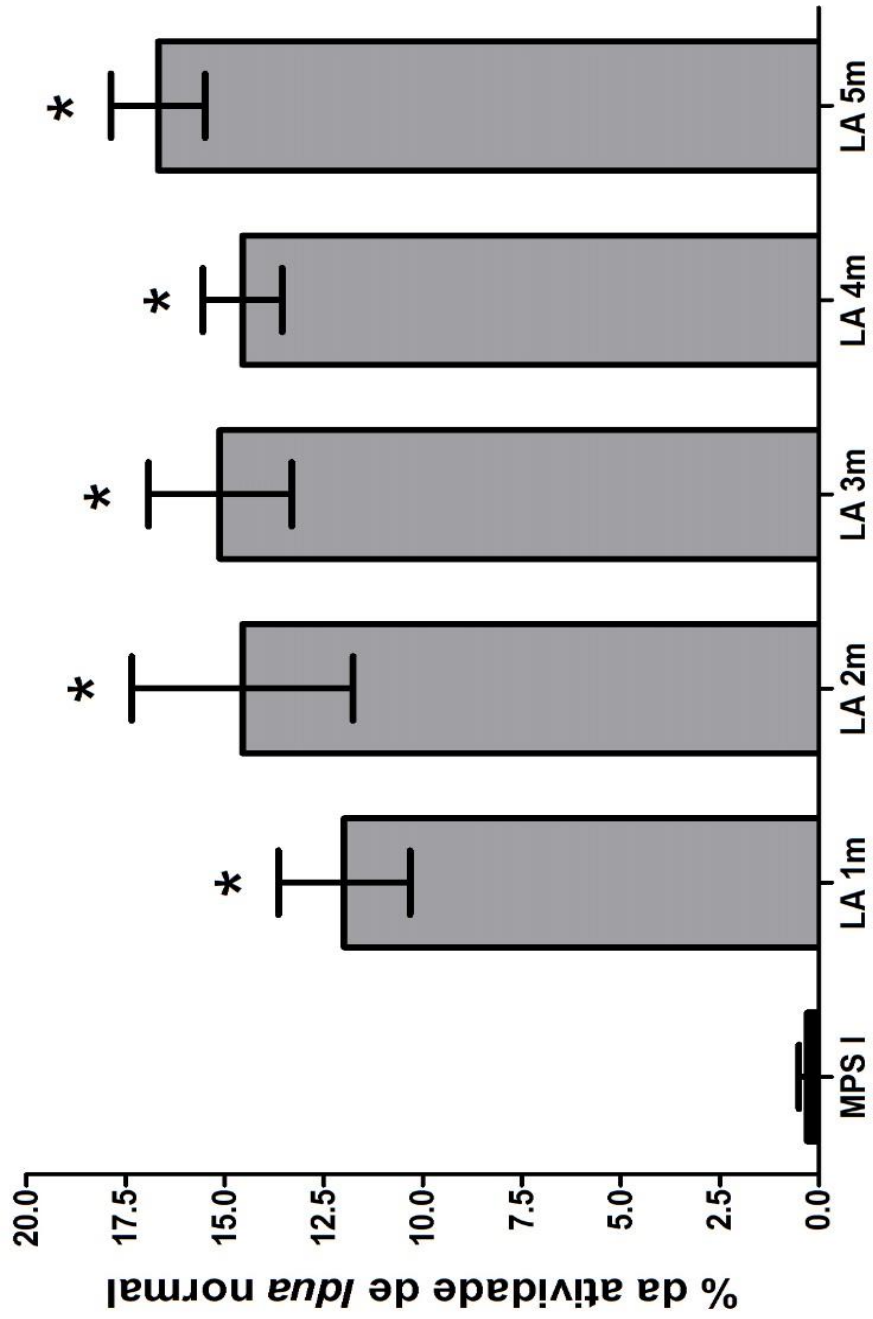


Figura 3

Resumo**COMPOSIÇÃO EDITORA DE GENOMA, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA
MESMA**

A presente invenção descreve uma composição editora de genoma compreendendo carreadores lipídicos de tamanho nanométrico (< 1,0 micrômetro) complexados com ao menos um ácido nucleico para ser administrada a células *in vitro*, ou após a remoção de células para modificação *ex vivo*, ou administrados *in vivo* inclusive via injeção hidrodinâmica, para fins de edição de genoma, e ainda os processos de obtenção de tal composição. A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia e consiste em formulações que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica e médica.