

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento de vetores nanotecnológicos lipídicos do sistema
CRISPR/Cas9 visando à terapia gênica para Mucopolissacaridose tipo I**

ROSELENA SILVESTRI SCHUH

PORTO ALEGRE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento de vetores nanotecnológicos lipídicos do sistema
CRISPR/Cas9 visando à terapia gênica para Mucopolissacaridose tipo I**

Tese apresentada por **Roselena Silvestri
Schuh** para obtenção do TÍTULO DE
DOUTORA em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Prof. Dr. Guilherme Baldo

PORTO ALEGRE, 2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 de novembro de 2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Elizandra Braganhol

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dr. Guido Lenz

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Nance Beyer Nardi

Universidade Luterana do Brasil

Prof. Dr. Ruy Carlor Ruver Beck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Schuh, Roselena Silvestri Desenvolvimento de vetores nanotecnológicos lipídicos do sistema CRISPR/Cas9 visando à terapia gênica para Mucopolissacaridose tipo I / Roselena Silvestri Schuh. -- 2017.

352 f.

Orientador: Helder Ferreira Teixeira.

Coorientador: Guilherme Baldo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BRRS, 2017.

1. Terapia gênica. 2. Mucopolissacaridose tipo I. 3. Lipossomas. 4. Nanoemulsões. 5. CRISPR. I. Teixeira, Helder Ferreira, orient. II. Baldo, Guilherme, coorient. III. Título.

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos e o projeto para o desenvolvimento deste trabalho; ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da UFRGS e ao Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que disponibilizaram os equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente tese.

“There are as many atoms in a single molecule of your DNA as there are stars in the typical galaxy...

We are, each of us, a little universe.”

(Neil deGrasse Tyson)

Agradecimentos

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Helder Teixeira, pela oportunidade e pela confiança depositada em minha capacidade de realizar o Doutorado sem ter o título de Mestre, pela atenção dispensada em todos os momentos, pelos ensinamentos incontáveis, e pelo exemplo ímpar de profissional e orientador.

Ao Prof. Dr. Guilherme Baldo, principalmente pela orientação e onipresença. Agradeço especialmente pela humildade de ir para a bancada ao meu lado, e por me alavancar além do que eu almejava. Admiro muito o cientista que és.

À Professora Ursula Matte, pela confiança depositada neste trabalho e pela orientação em diversos momentos.

Aos Professores Letícia Koester, Valquíria Bassani, e George Ortega pelos conselhos e atenção dispensada.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico pelo companheirismo, amizade e ajuda mútua. Em especial, às Prof^{as}. Fernanda Bruxel pelo apoio, orientação e amizade desde o meu TCC, Juliana Bidone pela companhia de todas as horas e Marina Nemitz por todo o apoio e ajuda. Agradeço a vocês: Dirnete, Michelle, Bruna, Sara, Lucélia, Lucíria, Tainá, Letícia, Flávia, Mariana, Kleyton, Luana, Giovanni, enfim, são muito amigos e colegas queridos.

Aos colegas e amigos do Centro de Terapia Gênica pela amizade, incentivo e ajuda de sempre. Especialmente à Édina Poletto, que foi minha maior companheira, mas também aos queridos Gabriela, Graziella, Talita, Amanda, Gabriel, Fabíola, Esteban, à Prof^a. Ana Paz e a todos os colaboradores da UAMP e veterinárias da UEA, em especial à Enf. Marta Cioatto e à Md. Vet. Daniela.

À UFRGS, PPGCF, HCPA e CNPq, pelo financiamento e pela bolsa de doutorado.

A meus familiares que foram a fundação mestra para dar suporte e incentivo aos meus estudos. Especialmente ao meu amado João que participou de cada etapa e cada momento feliz ou triste dessa jornada, agradeço pelo apoio incondicional de todas as horas.

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos, com encarte de publicações. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- Introdução;
- Objetivo geral e objetivos específicos;
- Revisão da literatura;
- Capítulo I – Artigo científico: Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses;
- Capítulo II – Artigo científico: Gene editing of MPS I human fibroblasts by co-delivery of a CRISPR/Cas9 plasmid and a donor oligonucleotide using nanoemulsions as nonviral carriers;
- Capítulo III – Artigo científico: Physicochemical properties of cationic nanoemulsions and liposomes obtained by microfluidization complexed with a single plasmid or along with an oligonucleotide: implications for CRISPR/Cas technology;
- Capítulo IV – Artigo científico: *In vivo* gene editing of mucopolysaccharidosis I mice using the CRISPR/Cas9 system;
- Capítulo V – Artigo científico: Neonatal nonviral gene editing with the CRISPR/Cas9 system improves cardiovascular, respiratory, and bone disease in mucopolysaccharidosis I mice;
- Discussão geral;
- Conclusões;
- Referências;
- Anexos: produção tecnológica relacionada.

RESUMO

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é causada pela deficiência de alfa-L-iduronidase (IDUA), responsável pelo catabolismo de glicosaminoglicanos (GAGs), levando ao acúmulo multissistêmico de sulfato de heparano e dermatano. Este estudo tem por objetivo avaliar o potencial de sistemas lipídicos nanoestruturados como carreadores do plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e um vetor doador da sequência do gene *IDUA/Idua* para edição gênica em fibroblastos de pacientes e em modelo murino de MPS I. Foram produzidos lipossomas (DOTAP, DOPE e DSPE-PEG) e nanoemulsões (e TCM) por homogeneização à alta pressão e microfluidização. O DNA foi associado às formulações por adsorção, ou por encapsulamento dos complexos pré-formados DNA/DOTAP no núcleo oleoso da nanoemulsão. A eficiência de transfecção dos complexos foi avaliada em fibroblastos de pacientes MPS I e ocorreu um aumento significativo da atividade de IDUA em 2, 15 e 30 dias após os tratamentos, que promoveu uma redução na quantidade de lisossomos nos fibroblastos tratados. A caracterização físico-química de formulações produzidas por microfluidização complexadas a somente um plasmídeo ou juntamente com um oligonucleotídeo foi verificada e pode-se afirmar que a capacidade de complexação e transfecção depende diretamente do tipo celular e da relação de cargas, e não há implicações quanto ao tamanho das sequências de ácidos nucleicos. Camundongos MPS I receberam os complexos lipossomais por injeção hidrodinâmica e sua biodistribuição foi detectada principalmente no pulmão, coração e fígado. A atividade sérica de IDUA normal aumentou em cerca de 6% e foi mantida por seis meses. A atividade aumentada no pulmão, coração, fígado e rim após eutanásia promoveu redução dos GAGs na urina e nos mesmos tecidos, corroborando com as análises histológicas. Em um estudo em andamento, foi realizada uma investigação mais aprofundada do efeito do tratamento lipossomal na morfologia óssea, sistemas cardiovascular e respiratório, e funções cerebrais dos animais tratados. A análise ecocardiográfica demonstrou uma melhora na hipertrofia e contratilidade do coração, porém não houve melhora na espessura das válvulas. O diâmetro da aorta foi similar ao de animais normais, porém as quebras de elastina ficaram entre o grupo normal e o não tratado. A morfologia facial dos animais tratados foi intermediária, assim como a espessura do osso zigomático. Entretanto, o osso femoral demonstrou espessura comparável ao normal. Já a resistência pulmonar apresentou uma tendência de redução nos animais tratados em relação aos animais MPS I. O conjunto de resultados demonstra o potencial das nanoestruturas lipídicas co-complexadas com o plasmídeo CRISPR/Cas9 e um vetor doador da sequência *IDUA/Idua* para terapia gênica da MPS I.

Palavras-chave: CRISPR/Cas9, mucopolissacaridose tipo I, terapia gênica, vetores não-virais.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is caused by the deficiency of alpha-L-iduronidase (IDUA), responsible for the catabolism of glycosaminoglycans (GAGs), leading to multisystemic accumulation of heparan and dermatan sulfate. This study aims to evaluate the potential of lipid-based nanostructures as carriers of the CRISPR/Cas9 plasmid and a vector donor of the *IDUA/Idua* sequence for gene editing in patients' fibroblasts and in a murine model of MPS I. Liposomes (DOTAP, DOPE, and DSPE-PEG) and nanoemulsions (also MCT) were produced through high-pressure homogenization or microfluidization. DNA was associated with liposomes and nanoemulsions by adsorption or by encapsulation of DNA/DOTAP preformed complexes in the oil core of nanoemulsions. The transfection efficiency of complexes was evaluated in fibroblasts from MPS I patients and a significant increase in IDUA activity was demonstrated at 2, 15, and 30 days after treatments. It was also possible to observe a significant reduction in lysosomal amount in treated fibroblasts. The physicochemical characterization of liposomes and nanoemulsions produced through microfluidization complexed with a single plasmid or along with an oligonucleotide has been verified and it can be stated that the complexing and transfection capacity of the complexes depends directly on the cell type and the charge ratio, and there are no implications of the size of the nucleic acid sequences. MPS I mice received the liposomal complexes by hydrodynamic injection and their immediate biodistribution was detected mainly in the lung, heart, and liver. An increase of about 6% in normal serum IDUA activity was maintained for six months, in addition to increased lung, heart, liver, and kidney activity after euthanasia. The enhanced enzymatic activity promoted a significant GAGs reduction in urine and in the same tissues, corroborating with histological analysis. In an ongoing study, a deeper investigation was carried out on the effect of liposomal treatment on bone morphology, cardiovascular and respiratory systems, and brain function. The echocardiographic analysis showed an improvement in the parameters of hypertrophy and contractility of the heart, but there was no improvement in heart valves. Aorta diameter was similar to that of normal animals, but elastin breaks were between the normal and untreated groups. Facial morphology of treated animals was intermediate, as well as the analysis of zygomatic bone thickness. However, femoral bone showed thickness comparable to normal animals. Lung resistance, on the other hand, showed a tendency to reduction in treated animals when compared to MPS I. The set of results demonstrates the potential of the co-complexed lipid nanostructures with the CRISPR/Cas9 plasmid and a donor vector of the *IDUA/Idua* sequence for MPS I gene therapy.

Keywords: CRISPR/Cas9, gene therapy, mucopolysaccharidosis, nonviral vectors.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1	Edição gênica induzida por nuclease.....	49
Figura 2	Sistema CRISPR/Cas9 em bactérias.....	50
Figura 3	Ferramenta CRISPR/Cas9 para edição gênica.....	51
Figura 4	Plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9.....	51

CAPÍTULO 1

Figura 1.1	Nanostructures of nanotechnology-based polymeric and lipid systems.....	68
-------------------	---	----

CAPÍTULO 2

Figura 2.1	Vectors.....	105
Figura 2.2	Schematic representation of the preparation of DNA/nanostructure complexes by adsorption or encapsulation of preformed hydrophobic DNA/DOTAP complex.....	106
Figura 2.3	Decomplexation of DNA from nanoemulsions.....	113
Figura 2.4	Transfection efficiency: percentage of normal IDUA activity achieved after incubation with complexes.....	114
Figura 2.5	Lysosome staining.....	116
Figura 2.6	Representative histograms of lysosome dyed live cells analyzed for fluorescence intensity levels.....	117
Mat. Supl. Figura 2.1	Transfection efficiency <i>in vitro</i> : IDUA activity in human fibroblasts and in supernatant (secreted IDUA).....	125
Mat. Supl. Figura 2.2	Representative dot plots of lysosome dyed live fibroblasts analyzed for fluorescence intensity.....	126

CAPÍTULO 3

Figura 3.1	Mean droplet size distribution of L, LPeg, N, and NPeg blank formulations according to the number of microfluidization cycles used for production.....	141
-------------------	--	-----

Figura 3.2	Migration of the CRISPR/Cas9 plasmid and the oligonucleotide from complexes and after 30 min of incubation with DNase I.....	145
Figura 3.3	Transmission electron (TEM) photomicrographs of NPeg, NPegP, NPegPO, LPeg, LPegP, and LPegPO.....	146
Figura 3.4	CRISPR/Cas9 plasmid and oligonucleotide decomplexation after 1h of incubation in DMEM, DMEM supplemented with 10 % FBS or pure mouse serum.....	147
Figura 3.5	CRISPR/Cas9 plasmid and oligonucleotide decomplexation after 24h of incubation in DMEM, DMEM supplemented with 10 % FBS or pure mouse serum.....	148
Figura 3.6	CRISPR/Cas9 plasmid and oligonucleotide decomplexation after 48h of incubation in DMEM, DMEM supplemented with 10 % FBS or pure mouse serum.....	149
Figura 3.7	Cell viability after incubation of increasing volumes of NPeg, NPegP, NPegPO, LPeg, LPegP, and LPegPO complexes with human fibroblasts, HEK-293, and Hep-G2 cells.....	150
Figura 3.8	Cell uptake assay with NBD-PE labeled NPegP, NPegPO, LPegP, and LPegPO complexes analyzed under a fluorescence microscope after 24 h of incubation.....	151

CAPÍTULO 4

Figura 4.1	Schematic representation of the preparation of liposome/DNA complexes by adsorption of DNA onto liposomes.....	170
Figura 4.2	Enzyme activity after gene editing <i>in vitro</i> : IDUA activity in human fibroblasts and in supernatant (secreted IDUA).....	178
Figura 4.3	Correction of lysosomal abnormalities after treatment <i>in vitro</i> . Fibroblasts were labeled with LysoDeep™ and DAPI™.....	179
Figura 4.4	Biodistribution of fluorescent liposome complexes after injection.....	180
Figura 4.5	Results of neonatal <i>in vivo</i> gene editing. The efficacy of the treatments was demonstrated by serum IDUA activity and urinary GAGs levels after injection of L/CRISPR+IDUA or Naked	181
Figura 4.6	Results of neonatal <i>in vivo</i> gene editing. The efficacy of the treatments was demonstrated by tissue IDUA activity and GAGs levels after injection of L/CRISPR+IDUA or Naked	182

Figura 4.7	Representative histological sections stained with Hematoxylin-eosin and Alcian blue stains of different organs from a normal, an untreated, a Naked CRISPR+IDUA-treated, and a L/CRISPR+IDUA-treated six-month old MPS I	183
Mat. Supl. Figura 4.1	Oligonucleotide vectors used <i>in vitro</i> . (A) A 20 bp target sequence adjacent to a NGG (PAM sequence, highlighted) which is distant 16 nucleotides of the mutated base on Trp402* (G to A, highlighted). (B) Sequence of the 134 bases, homologous to the Trp402* region, oligonucleotide used for targeted recombination.....	192
Mat. Supl. Figura 4.2	Schematic design of the donor vector used for homologous recombination <i>in vivo</i>	192
Mat. Supl. Figura 4.3	Cell viability after incubation of increasing volumes of blank liposome and L/CRISPR+IDUA complexes.....	192
Mat. Supl. Figura 4.4	Enzyme activity after gene editing <i>in vitro</i> : IDUA activity in human fibroblasts and in supernatant (secreted IDUA).....	193

CAPÍTULO 5

Figura 5.1	Facial morphology and body weight.....	208
Figura 5.2	Effect of gene editing on bone abnormalities.....	209
Figura 5.3	Cardiovascular parameters assessed by echocardiography.....	210
Figura 5.4	Heart valves thickening and GAGs storage.....	210
Figura 5.5	Pathology in the aorta.....	211
Figura 5.6	Respiratory disease.....	212
Figura 5.7	Behavior analysis: open field and inhibitory avoidance test.....	213
Figura 5.8	Neuroinflammation.....	214
Mat. Supl. Figura 5.1	Correlation between GAGs levels and IDUA activity in (A) urine GAGs levels <i>versus</i> serum IDUA, (B) heart, and (C) lung.....	220

DISCUSSÃO GERAL

Figura 5.	Visualização do NGS (sequenciamento de nova geração) de uma amostra de DNA genômico após transfecção com os complexos.....	227
------------------	--	-----

Figura 6.	Visualização pelo microscópio óptico da incubação de nanoemulsões pegiladas (A) e nanoemulsões sem adição de DSPE-PEG (B) com meio de cultura DMEM em cultura de fibroblastos	229
Figura 7.	Visualização da veia temporal superficial de camundongo MPS I neonato. A seta indica a localização da inserção da agulha para injeção.....	232
Figura 8.	Atividade de IDUA nos tecidos cerebrais de animais MPS I tratados por via nasal durante 30 dias com o complexo lipossomal.....	235

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1	Nanostructures: advantages, disadvantages, and references of applications.....	70
Tabela 1.2	Biomaterials: advantages, disadvantages, and references of applications.....	71
Tabela 1.3	Enzyme, gene, and GAGs involved in each MPS.....	77
Tabela 1.4	Recombinant enzymes available for MPS diseases.....	79

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1	Physicochemical properties of L, LA, N, NA, and NE formulations at +4/ -1 charge ratios: droplet size, polydispersity index (P.I.), and Zeta potential.....	112
Mat. Supl. Tabela 2.1	Prediction of possible off-target events in exons (crispr.mit.edu).....	124

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1	Physicochemical properties of L, LP, LPO, LPeg, LPegP, and LPegPO formulations and complexes at +0.1/ -1, +1/ -1, +2/ -1, and +4/ -1 charge ratios.....	142
Tabela 3.2	Physicochemical properties of N, NP, NPO, NPeg, NPegP, and NPegPO formulations and complexes at +0.1/ -1, +1/ -1, +2/ -1, and +4/ -1 charge ratios.....	143

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1	Physicochemical properties of formulations.....	177
-------------------	---	-----

CAPÍTULO 5

Tabela 5.1	Effect of neonatal gene therapy on serum IDUA levels, urinary GAGs and pathology of visceral tissues.....	208
-------------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

AAV	<i>Adeno-associated virus</i>
Apo	<i>Apolipoprotein</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
BBB	<i>Blood-brain barrier</i>
BRB	<i>Blood-retinal barrier</i>
cDNA	DNA complementar
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced palindromic repeats</i>
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9</i>
crRNA	RNA CRISPR
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
DDAB	Didecyldimethylammonium bromide
DL	Doença lisossômica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNase I	Deoxirribonuclease I
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DOTAP	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane
DSPE-PEG	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino (polyethylene glycol)-2000]
ERT	<i>Enzymatic replacement therapy</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
gDNA	<i>Genomic DNA</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GUS	Beta-glucuronidase
HDR	<i>Homogous directed repai</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HSCT	<i>Hematopoietic stem cell therapy</i>
IDUA	Enzima alfa-L-iduronidase
<i>IDUA</i>	Gene da alfa-L-iduronidase humana
<i>Idua</i>	Gene da alfa-L-iduronidase murina
IgG	<i>Immunoglobulin G</i>
KO	<i>Knockout</i>
L	Lipossoma branco ou <i>blank liposome</i>
LA	Lipossoma com DNA adsorvido
LCT	<i>Long chain triglycerides</i>
LSD	<i>Lysosomal storage disease</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LNC	<i>Lipid core nanocapsule</i>
LP	Lipossoma associado a um plasmídeo
LPA	Lipossoma peguilado com DNA adsorvido
LPeg	Lipossoma peguilado associado a um plasmídeo
LPegPO	Lipossoma peguilado associado a um plasmídeo e um oligo
LPO	Lipossoma associado a um plasmídeo e um oligonucleotídeo
LPegP	Lipossoma peguilado branco ou blank Pegylated Liposome
MCT	<i>Medium chain triglycerides</i>
MPS	Mucopolissacaridoses

MPS I	Mucopolissacaridose tipo I
M6F	Manose-6-fosfato
M6P	<i>Mannose-6-phosphate</i>
M6PR/M6FR	Receptor de manose-6-fosfato
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
N	Nanoemulsão branca ou <i>blank nanoemulsion</i>
NA	Nanoemulsão com DNA adsorvido
NBD-PE	N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine
NE	Nanoemulsão com DNA encapsulado
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NP	Nanoemulsão associada a um plasmídeo
NPeg	Nanoemulsão peguilada
NPegP	Nanoemulsão peguilada associada a um plasmídeo
NPegPO	Nanoemulsão peguilada associada a um plasmídeo e um oligo
NPO	Nanoemulsão associada a um plasmídeo e um oligonucleotídeo
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
O/W	<i>Oil-in-water</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motifs</i>
PBCA	<i>Polybutyl cyanoacrylate</i>
PC	<i>Phosphatidylcholine</i> - Fosfatidilcolina
PCL	<i>Poly-ε-caprolactone</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCS	<i>Photon correlation spectroscopy</i>
PEG	<i>Polyethylene glycol</i> - Polietilenoglicol
PEG-PLGA	<i>Polyethylene glycol-poly lactic co-glycolic acid</i>
PGA	<i>Polyglycolic acid</i>
PLA	<i>Polylactic acid</i>
PLGA	<i>Polylactic co-glycolic acid</i>
PI	<i>Polidispersity index</i> – IP índice de polidispersão
POPC	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine</i>
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RH	Reparação homóloga
RNA	Ácido ribonucleico
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
Span®	<i>Sorbitan monostearate</i>
TALEN	<i>Transcriptional activator-like effector nuclease</i>
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
TCU	Transplante de cordão umbilical
TMO	Transplante de medula óssea
tracrRNA	CRISPR RNA transativador
TRE	Terapia de Reposição Enzimática
Tween®	<i>Polysorbate</i>
UENH	União de extremidades não homólogas
ZFN	<i>Zinc finger nuclease</i>
W/O	<i>Water-in-oil</i>
ζ-Potential	<i>Zeta potential</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	31
Referências	33
OBJETIVOS	35
Objetivo geral	37
Objetivos específicos	37
REVISÃO DA LITERATURA	39
O lisossomo e as doenças lisossômicas	41
Mucopolissacaridose tipo I: caracterização da patologia e tratamento	42
Terapia gênica.....	44
Edição gênica.....	48
Referências	53
CAPÍTULO 1	59
1.1. Introdução	61
1.2. ARTIGO CIENTÍFICO	63
Nanotechnology Applied to Treatment of Mucopolysaccharidoses	65
Introduction.....	67
Nanotechnology-based systems	68
Biomaterials used in nanotechnology-based systems.....	70
Lipids.....	72
Phospholipids.....	72
Cationic lipids	73
Oils and surfactants.....	73
Other lipids	74
Polymers	75
Cationic Polymers	76
Mucopolysaccharidoses	76
Enzyme delivery for MPS and nanotechnology	79
Gene therapy for MPS and nanotechnology	82
Conclusions.....	84
Expert opinion	85
References	86

CAPÍTULO 2.....	95
2.1. Introdução.....	97
2.2. ARTIGO CIENTÍFICO.....	99
Gene editing of MPS I human fibroblasts by co-delivery of a CRISPR/Cas9 plasmid and a donor oligonucleotide using nanoemulsions as nonviral carriers.....	101
Abstract.....	102
Introduction.....	103
Materials and Methods.....	104
Vectors.....	104
Preparation of formulations.....	106
Preparation of blank formulations.....	106
Preparation of the hydrophobic DNA/DOTAP complex.....	107
Preparation of DNA/nanostructure complexes.....	107
Droplet size and zeta potential.....	108
Agarose gel electrophoresis.....	108
<i>In vitro</i> experiments.....	108
Cell viability assay.....	109
Gene transfer.....	109
IDUA activity.....	110
CytoPainter LysoDeep® Red Indicator labeling.....	110
Confocal microscopy.....	110
Flow cytometry.....	111
Data analysis.....	111
Results.....	112
Physicochemical properties of the formulations.....	112
DNA decomplexation assay.....	112
<i>In vitro</i> experiments.....	114
IDUA activity.....	114
Confocal microscopy.....	115
Flow cytometry.....	117
Discussion.....	118
Conclusion.....	120
References.....	121

Supplementary material	124
CAPÍTULO 3.....	127
3.1. Introdução	129
3.2. ARTIGO CIENTÍFICO	131
Physicochemical properties of cationic nanoemulsions and liposomes obtained by microfluidization complexed with a single plasmid or along with an oligonucleotide: implications for CRISPR/Cas technology	133
Abstract.....	134
Introduction.....	135
Materials and Methods	136
Vectors	136
Preparation of formulations and complexes	136
Preparation of formulations	136
Preparation of complexes.....	137
Characterization of complexes	137
Physicochemical properties.....	137
Nucleic acids complexation, decomplexation and stability	138
Morphology.....	138
<i>In vitro</i> experiments.....	138
Cell viability assay	139
Cell uptake assay with NBD-PE labeled formulations	139
Flow cytometry	140
Data analysis.....	140
Results	140
Physicochemical properties of the formulations	140
Loading and stability of complexes.....	144
Morphological Analysis.....	145
Decomplexation of nucleic acids	146
<i>In vitro</i> assays	149
Cell viability assay	149
Cell uptake assay with NBD-PE labeled formulations	151
Discussion	152
Conclusion.....	155

References	156
CAPÍTULO 4.....	159
4.1. Introdução.....	161
4.2. ARTIGO CIENTÍFICO.....	163
<i>In vivo</i> gene editing of mucopolysaccharidosis I mice using the CRISPR/Cas9 system	165
Abstract.....	166
Introduction	167
Materials and Methods.....	168
Vectors.....	168
Vectors for <i>in vitro</i> experiments	168
Vectors for <i>in vivo</i> experiments.....	169
Preparation of formulations.....	169
Fluorescent liposome for <i>in vivo</i> experiments	171
Droplet size and zeta potential.....	171
<i>In vitro</i> experiments	171
Cell viability assay	171
Gene transfer.....	172
IDUA activity	172
CytoPainter LysoDeep™ Red Indicator labeling.....	173
Confocal microscopy.....	173
Flow cytometry.....	173
<i>In vivo</i> experiments.....	174
Animal model.....	174
Biodistribution of fluorescent complexes after hydrodynamic injection	174
Flow cytometry.....	175
IDUA activity	175
GAGs levels.....	175
Histological analyzes	176
Ethics statement and statistics.....	176
Results.....	176
Physicochemical properties of the formulations.....	176
<i>In vitro</i> experiments	177
IDUA activity	177

Lysosomal storage	178
<i>In vivo</i> experiments	180
Biodistribution of fluorescent liposome complexes	180
Idua activity and GAGs measurement.....	180
Tissue GAGs storage	183
Discussion	184
Conclusion.....	187
References	187
Supplementary material	192
CAPÍTULO 5.....	195
5.1. Introdução	197
5.2. ARTIGO CIENTÍFICO.....	199
Neonatal nonviral gene editing with the CRISPR/Cas9 system improves cardiovascular, respiratory, and bone disease in mucopolysaccharidosis I mice	201
Abstract.....	202
Introduction.....	203
Materials and Methods.....	204
Animal procedures	204
Echocardiographic assessment.....	204
Behavioral tests.....	205
Open field test	205
Repeated open field test	205
Inhibitory avoidance	205
Histological analyzes.....	206
Radiographs.....	206
Plethysmography.....	206
Ethics statement and statistics	207
Results	207
Mouse facial morphology and body weight	207
Bone Pathology	209
Cardiovascular disease	209
Pathology in the aorta and heart valves	210
Respiratory disease.....	212

Behavior analysis and brain histology.....	212
Discussion	214
Conclusion	217
References	217
Supplementary material.....	221
DISCUSSÃO GERAL	223
Referências.....	238
CONCLUSÃO	241
ANEXOS	245
ANEXO 1	247
Patente de inovação depositada no INPI	
Composição editora de genoma, processo de obtenção e uso da mesma	247
ANEXO 2.....	299
Patente de inovação depositada no INPI	
Composição para terapia gênica do sistema nervoso central, processo de obtenção e uso da mesma	299

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença lisossômica (DL) progressiva multissistêmica, causada pela deficiência de alfa-L-iduronidase (IDUA), responsável pela degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) sulfato de heparano e dermatano em diversos tecidos (GIUGLIANI, 2012). Atualmente existem dois tratamentos disponíveis para a MPS I, a terapia de reposição enzimática (TRE) e o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Contudo, as alternativas terapêuticas atuais não são completamente satisfatórias, visto que não são totalmente eficazes em reverter ou retardar os desfechos clínicos da doença (GIUGLIANI et al., 2010). Sendo assim, a busca por novas terapias para a MPS I tem sido crescente, dentre as quais se destaca a terapia gênica (GIUGLIANI et al., 2012), que consiste na inserção de um gene funcional a fim de corrigir uma disfunção celular ou prover novas funções à célula.

Apesar de promissora, a terapia gênica enfrenta diversas limitações relacionadas à capacidade de penetração e estabilidade intracelular dos ácidos nucleicos (BALDO; GIUGLIANI; MATTE, 2014). Com o intuito de transpor essas dificuldades, algumas estratégias têm sido utilizadas, como a veiculação dos ácidos nucleicos mediante complexação com vetores não-virais lipídicos, como lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas. Estudos recentes têm demonstrado as potencialidades do uso de vetores nanotecnológicos lipídicos como carreadores de ácidos nucleicos para terapia gênica (FRAGA et al., 2008, 2011, 2015; LIU; YU, 2010; MCNEIL; PERRIE, 2006; NORDLING-DAVID; GOLOMB, 2013).

Contudo, a curta duração da expressão gênica após a liberação do material genético no interior da célula representa uma limitação da terapia gênica com vetor episomal, visto que raramente ocorre sua integração ao genoma (CARVALHO et al., 2015). Nesse contexto, o sistema CRISPR/Cas (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats) surgiu como uma nova ferramenta que pode possibilitar a edição gênica e a integração da sequência exógena ao genoma (CONG et al., 2013; MALI et al., 2013; RAN et al., 2013). O desenvolvimento de vetores nanotecnológicos lipídicos do sistema CRISPR/Cas9 para terapia gênica da MPS I pode possibilitar a entrega intracelular do material genético e posterior edição e correção genômica a fim de habilitar a célula a produzir a enzima deficiente. Partindo-se dessa hipótese, a presente tese de doutorado tem por objetivo principal desenvolver sistemas

nanotecnológicos lipídicos como carreadores do sistema CRISPR/Cas9 para terapia gênica da MPS I. A tese está apresentada em cinco capítulos:

- O primeiro capítulo apresenta uma revisão do tema apresentando diferentes aspectos relacionados à nanotecnologia aplicada ao tratamento das mucopolissacaridoses.

- O capítulo 2 descreve a eficiência de transfecção *in vitro* de nanoemulsões produzidas por homogeneização à alta pressão complexadas de duas maneiras diferentes com o plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e com o oligonucleotídeo doador da sequência correta do gene *IDUA* para correção da mutação Trp402* em fibroblastos de pacientes MPS I.

- No capítulo 3 está descrita a caracterização físico-química de lipossomas e nanoemulsões produzidos por microfluidização co-complexados com o plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e com um plasmídeo ou um oligonucleotídeo doador da sequência correta do gene de interesse para recombinação homóloga.

- O capítulo 4 investiga a eficiência de transfecção *in vitro* de lipossomas produzidos por microfluidização complexados com o plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e com o oligonucleotídeo doador da sequência correta do gene *IDUA* para correção da mutação Trp402* em fibroblastos de pacientes MPS I e ainda estuda o efeito da injeção hidrodinâmica neonatal de lipossomas complexados com os plasmídeos do sistema CRISPR/Cas9 e com o doador da sequência da *Idua* em camundongos MPS I neonatos, nocautes para o gene *Idua*.

- O capítulo 5 investiga mais profundamente os efeitos do tratamento neonatal com os lipossomas do capítulo anterior sobre o sistema cardiovascular e morfologia da aorta, sistema respiratório, cérebro e comportamento, e ainda sobre o fenótipo e morfologia óssea dos animais adultos.

REFERÊNCIAS

- BALDO, G.; GIUGLIANI, R.; MATTE, U. Gene delivery strategies for the treatment of mucopolysaccharidoses. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 3, p. 449–459, 2014.
- CARVALHO, T. G. et al. Genome Editing: Potential Treatment for Lysosomal Storage Diseases. **Current Stem Cell Reports**, v. 1, n. 1, p. 9–15, 2015.
- CONG, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013.
- FRAGA, M. et al. Evaluation of the toxicity of oligonucleotide/cationic nanoemulsion complexes on Hep G2 cells through MTT assay. **Die Pharmazie**, v. 63, n. 9, p. 667–670, 2008.
- FRAGA, M. et al. Influence of phospholipid composition on cationic emulsions/DNA complexes: physicochemical properties, cytotoxicity, and transfection on Hep G2 cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2213–2220, 2011.
- FRAGA, M. et al. PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 37–46, 2015.
- GIUGLIANI, R. et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 589–604, 2010.
- GIUGLIANI, R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 924–931, 2012.
- GIUGLIANI, R. et al. Emerging treatment options for the mucopolysaccharidoses. **Research and Reports in Endocrine Disorders**, v. 2, p. 53–64, 2012.
- JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012.
- LIU, C.-H.; YU, S.-Y. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 79, n. 2, p. 509–515, set. 2010.
- MALI, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 2013.
- MCNEIL, S. E.; PERRIE, Y. Gene delivery using cationic liposomes. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 16, n. 10, p. 1371–1382, 2006.
- NORDLING-DAVID, M. M.; GOLOMB, G. Gene Delivery by Liposomes. **Israel Journal of Chemistry**, v. 53, n. 9–10, SI, p. 737–747, 2013.
- RAN, F. A. et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380–1389, set. 2013.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

A presente tese tem por objetivo geral desenvolver e caracterizar formulações nanotecnológicas lipídicas co-complexadas com um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e um vetor doador do gene *IDUA/Idua*, visando à terapia gênica em fibroblastos de pacientes MPS I *in vitro* e em camundongos MPS I *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar nanoemulsões por homogeneização a alta pressão, caracterizar as propriedades físico-químicas e avaliar a eficiência de transfecção e edição gênica dos complexos formados com o plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e doador da sequência correta para corrigir a mutação Trp402* no gene *IDUA* em fibroblastos de pacientes MPS I.

- Preparar nanoemulsões e lipossomas por microfluidização, complexar com um plasmídeo ou uma mistura de plasmídeo e oligonucleotídeo, caracterizar as propriedades físico-químicas e avaliar a captação celular dos complexos, a fim de verificar prováveis implicações na vetorização do sistema CRISPR/Cas.

- Avaliar *in vitro* a viabilidade celular e a eficiência de transfecção e edição gênica de lipossomas produzidos por microfluidização co-complexados ao plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e ao oligonucleotídeo doador da sequência correta para corrigir a mutação Trp402* no gene *IDUA* em fibroblastos de pacientes MPS I;

- Avaliar *in vivo* a eficiência de edição gênica após injeção hidrodinâmica dos lipossomas co-complexados ao plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e ao plasmídeo doador da sequência completa do gene *Idua* em camundongos neonatos MPS I nocautes para o gene *Idua*.

- Avaliar os efeitos que o tratamento com os complexos lipossomais pode gerar nos camundongos adultos, mais especificamente nos sistemas cardiovascular e respiratório, cérebro, comportamento e morfologia óssea.

REVISÃO DA LITERATURA

O LISSOSSOMO E AS DOENÇAS LISSOSSÔMICAS

Os lisossomos são organelas que apresentam pH interno ácido e são encontradas em todas as células de mamíferos, exceto nas hemácias. São estruturas formadas por uma membrana fosfolipídica, contendo no seu interior uma série de hidrolases, responsáveis pela degradação de macromoléculas (SAFTIG; HAAS, 2016). Sua biogênese ocorre a partir da fusão de autofagossomas com endossomas ou, ainda, pela acidificação de endossomas no citosol das células (SAFTIG; KLUMPERMAN, 2009). A principal função do lisossomo é a degradação de biomoléculas, mas também está envolvido em diversos processos como autofagia (SAFTIG; HAAS, 2016), defesa contra invasores exógenos e sinalização e morte celular (REPNIK et al., 2012).

O tráfego das enzimas lisossômicas até os endossomas ocorre por meio de dois receptores de manose-6-fosfato (M6PR) localizados na membrana celular (no caso de enzimas recicladas) e no complexo de golgi (no caso de enzimas recém-sintetizadas). No pH ácido do lisossomo o receptor se desliga das enzimas, que se tornam ativas nesse meio (SAFTIG; KLUMPERMAN, 2009). A deficiência de alguma proteína lisossômica geralmente está associada a uma condição patológica e esse grupo de doenças é conhecido como doenças lisossômicas (DL).

As doenças lisossômicas são erros inatos do metabolismo em que ocorre a deficiência total ou parcial de uma enzima ou de proteínas responsáveis pela biogênese e maturação dos lisossomos. Essa deficiência causa um acúmulo gradual de macromoléculas complexas não metabolizadas ou parcialmente metabolizadas. O tipo de substrato acumulado é utilizado para caracterizar os grandes grupos de DL, que incluem as mucopolissacaridoses (MPS, caracterizada por acúmulo de glicosaminoglicanos), lipidoses (lipídios), glicogenoses (glicogênio) e oligossacaridoses (de pequenos açúcares) (PARENTI; ANDRIA; BALLABIO, 2015). A gravidade dos sintomas dependerá do tipo e da quantidade de macromoléculas acumuladas nos tecidos, como também das consequências patológicas dessa alteração. Na maioria das DL o acúmulo inicia em idade fetal e torna-se clinicamente evidente nos primeiros dois anos de vida. A característica principal dessas doenças é seu curso progressivo com alta morbidade e mortalidade (GIUGLIANI, 2012a).

MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I: CARACTERIZAÇÃO DA PATOLOGIA E TRATAMENTO

As mucopolissacaridoses (MPS) são doenças genéticas raras crônicas e progressivas, causadas pela deficiência de enzimas lisossômicas envolvidas no catabolismo de glicosaminoglicanos (GAGs). Os GAGs sulfato de dermatano, sulfato de heparano, sulfato de queratano, sulfato de condroitina e ácido hialurônico que não são degradados ou são apenas parcialmente degradados por vias alternativas acumulam-se nos lisossomos, resultando em disfunção celular, tecidual e orgânica generalizadas (MUENZER, 2011). As consequências são sinais e sintomas multissistêmicos que se apresentam como face característica, opacificação da córnea, cardiopatia, perda auditiva, problemas respiratórios, hepatoesplenomegalia, limitação de mobilidade articular e inclusive pode ocorrer dano nas funções cognitivas (GIUGLIANI, 2012b).

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença lisossômica progressiva multissistêmica, causada pela deficiência da enzima lisossômica alfa-L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76), que impossibilita a degradação dos GAGs sulfato de heparano e sulfato de dermatano em diversos tecidos. O sulfato de heparano é composto principalmente por ácido glicurônico e glicosaminas, estando presente em proteoglicanos associados à membrana plasmática de diversos tipos celulares, inclusive de neurônios. O sulfato de dermatano é composto principalmente por ácido L-idurônico e N-acetilgalactosamina sulfatada e está presente na matriz de tecidos conectivos, como tendões e válvulas cardíacas (FULLER; MEIKLE; HOPWOOD, 2004; MEIKLE; FULLER; HOPWOOD, 2011).

A MPS I é causada por mutações no gene *IDUA*, localizado em seres humanos no braço curto do cromossomo 4 (4p16.3). Em humanos, o gene *IDUA* tem tamanho total de 19 Kb e possui 14 éxons que originam um mRNA de 2,3 Kb e uma proteína de 653 aminoácidos (SCOTT et al., 1992). A enzima tem um tamanho inicial de 73 KDa e é processada a uma forma madura de 69 KDa. No Brasil, existem duas mutações que são particularmente prevalentes, a Trp402* e a Pro533Arg, que estão presentes em cerca de 70% dos pacientes (MATTE et al., 2003).

As manifestações clínicas da MPS I são heterogêneas, sendo reconhecidas três formas principais: MPS IH ou Síndrome de Hurler (forma grave) (OMIM #607014), MPS IH/S ou Síndrome de Hurler-Scheie (forma intermediária) (OMIM #607015) e MPS IS ou Síndrome de Scheie (forma atenuada) (OMIM #607016) (MUENZER, 2011; MUENZER; WRAITH; CLARKE, 2009). 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 (GIUGLIANI, 2012c). A incidência mundial estimada da MPS I é de cerca de 1:100.000 nascidos vivos e aproximadamente 50 a 80% dos pacientes têm a forma mais grave da doença (MUENZER; WRAITH; CLARKE, 2009). O diagnóstico inicial da MPS I é baseado no reconhecimento dos sintomas clínicos, em testes bioquímicos para detecção de GAGs na urina e em ensaios enzimáticos. Os últimos são realizados em fibroblastos cultivados, plasma ou leucócitos e utilizam substratos fluorescentes específicos para IDUA. A deficiência na atividade da enzima e a excreção aumentada de GAGs urinários estão presentes em todos os pacientes (GIUGLIANI, 2012c).

Há dois tratamentos disponíveis para a MPS I, a terapia de reposição enzimática (TRE) e o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). A TRE consiste na administração intravenosa semanal da versão recombinante da enzima IDUA humana produzida por engenharia genética (GIUGLIANI et al., 2010). Ambos se baseiam no fato de que a enzima IDUA é modificada com resíduos de manose-6-fosfato (M6F), podendo ser captada por receptores específicos para enzimas lisossômicas, os receptores de manose-6-fosfato (M6FR) das células adjacentes (TOMANIN et al., 2012). Apesar da TRE ser a terapêutica atual mais segura e eficiente, ela possui como limitadores o acesso a determinados órgãos, como cérebro, ossos, olhos e cartilagens (CLARKE et al., 2009), além da baixa adesão ao tratamento. Por fim, o custo de cerca de R\$ 850.000,00 anuais por paciente, justifica a busca de novas estratégias para o tratamento da doença (GIUGLIANI et al., 2012). Já o TCTH, que inicialmente era realizado a partir do transplante de medula óssea (TMO), e mais recentemente tem sido realizado através do transplante de cordão umbilical (TCU) (MUENZER; WRAITH; CLARKE, 2009), permite que as células transplantadas produzam e distribuam a enzima aos diferentes órgãos através da reconstituição do sistema hematopoiético. 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 (LUND, 2013). 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 et al., 2010).

As alternativas terapêuticas atuais não são completamente satisfatórias, visto que não são completamente eficazes. Sendo assim, tem-se buscado novas terapias para a MPS I. Essas alternativas incluem a TRE intratecal (DICKSON et al., 2015; VERA et al., 2013), terapia de redução do substrato (COUTINHO; SANTOS; ALVES, 2016; GIUGLIANI et al., 2010), administração de chaperonas farmacológicas (GIUGLIANI et al., 2012) e as diversas formas de terapia gênica (BALDO et al., 2012; FRAGA et al., 2015a).

TERAPIA GÊNICA

Dentre as novas alternativas para o tratamento da MPS I, surge 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, 2011).

As doenças lisossômicas como as MPS, são excelentes candidatas à terapia gênica, uma vez que são causadas por deficiências em genes únicos, não são reguladas por mecanismos complexos e uma atividade enzimática de apenas 10-20% dos níveis normais tem eficácia clínica (CARVALHO et al., 2015). No caso da MPS I, cerca de 5 a 20% das enzimas lisossomais produzidas em uma célula são liberadas do citoplasma e captadas via endocitose por outras células, o que faz com que a correção do gene *IDUA* em uma pequena fração de células possa fornecer quantidades de enzima suficientes para tratar todos os tecidos afetados. Isso é possível devido à denominada correção cruzada (*cross-correction*) (HARTUNG et al., 1999; MUENZER, 2011), em que as células produtoras da enzima a liberam no interstício e as células adjacentes captam a enzima liberada que possui um resíduo

de manose 6-fosfato (M6P) e a internalizam via receptores de manose 6-fosfato (M6PR) (HARTUNG et al., 1999; KREUTER et al., 2002).

Atualmente, há mais de 2000 estudos clínicos aprovados em terapia gênica e já existem 16 medicamentos no mercado, dentre eles o Carticel® (Genzyme, USA), uma cultura de condrócitos autóloga para uso no reparo de defeitos da cartilagem do côndilo femoral e o Provenge® (Dendreon, USA), imunoterapia celular autóloga para o tratamento de certos tipos de câncer de próstata.

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 aniônico, à possibilidade de interação e agregação com proteínas, além da ocorrência de degradação enzimática (LIU; YU, 2010). 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 não-virais.

Os vetores virais utilizados em terapia gênica sofrem modificações na estrutura para torná-los mais seguros. Os genes que controlam sua replicação são retirados e o gene terapêutico é adicionado. Os quatro tipos de vetores virais mais comuns utilizados para terapia gênica *in vivo* ou *ex vivo* são adenovírus, vírus adenoassociados, lentivírus e retrovírus, sendo que atualmente os vírus adenoassociados têm recebido especial atenção em estudos clínicos. São vírus pequenos, formados por uma fita simples de DNA, não patogênicos, e que normalmente não se integram no genoma da célula hospedeira, porém possuem expressão sustentada a longo termo, e alguns podem ultrapassar a barreira hematoencefálica. No entanto, são difíceis de produzir em larga escala (FOUST et al., 2009).

Apesar da grande eficiência de inserção e transdução oferecidas pelos vetores virais, eles apresentam alguns problemas relacionados à imunogenicidade e segurança, principalmente pelo potencial de mutagênese insercional dos mesmos (YIN et al., 2014). Uma alternativa interessante são os vetores não-virais, de relativa facilidade e baixo custo de produção e de armazenamento em larga escala, menor

toxicidade, maior segurança e considerável capacidade de transfecção (LAVIGNE; GÓRECKI, 2006; VERISSIMO et al., 2010).

Nosso grupo demonstrou tanto *in vitro*, em fibroblastos de pacientes, quanto *in vivo*, em camundongos MPS I, a eficiência de transfecção, medida por atividade enzimática da IDUA, de nanoemulsões catiônicas como vetores carreadores de um plasmídeo contendo o gene da *IDUA* (FRAGA et al., 2015a, 2015b, 2017).

A transfecção mediante o uso de vetores não-virais pode se dar através de estruturas poliméricas ou lipídicas, sendo seguras no que se refere à toxicidade, à biocompatibilidade e biodegradabilidade dos componentes utilizados (MORILLE et al., 2008). Os lipossomas catiônicos (NORDLING-DAVID; GOLOMB, 2013), as nanopartículas lipídicas sólidas (BONDÌ; CRAPARO, 2010) e as nanoemulsões catiônicas (BRUXEL et al., 2013; FRAGA et al., 2015a; LIU; YU, 2010) estão dentre os vetores não-virais lipídicos mais descritos. Lipossomas catiônicos podem ser definidos como dispersões aquosas de uma mistura binária de um fosfolípido e de um lipídio catiônico, organizadas na forma de bicamadas e com um núcleo aquoso central. Já as nanopartículas lipídicas sólidas e as nanoemulsões catiônicas organizam-se como monocamadas com um núcleo lipídico sólido ou líquido, dispersas em uma fase aquosa (geralmente do tipo O/A), e estabilizadas por um filme interfacial constituído geralmente pelos mesmos lipídios utilizados na obtenção dos lipossomas (SCHUH; BRUXEL; TEIXEIRA, 2014).

Independentemente da estrutura formada, esses sistemas não-virais contêm um lipídio catiônico 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/DNA (FRAGA et al., 2008, 2011, 2015a; LV et al., 2006; NORDLING-DAVID; GOLOMB, 2013). 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 fosfolípidios ligados covalentemente a polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG), parece conferir um maior tempo de circulação aos complexos aumentando assim sua biodistribuição nos tecidos e conseqüentemente, a capacidade de transfecção (FRAGA et al., 2015a; KIM et al., 2006; MORILLE et al., 2008).

As propriedades dos complexos nanoestruturas lipídicas/DNA são influenciadas pela composição, pelas técnicas de preparação, bem como pela relação de cargas entre os grupamentos carregados dos lipídios catiônicos e ácidos nucleicos. Uma vasta literatura descreve a otimização dos complexos, especialmente em termos de diâmetro e carga de superfície (BRUXEL et al., 2013; FRAGA et al., 2015b; KWON et al., 2008; NAM et al., 2009). Em virtude de os ácidos nucleicos serem adsorvidos mediante formação de par iônico, uma rápida liberação pode estar relacionada a esse tipo de complexo. A fim de obter-se uma melhor incorporação e proteção dos ácidos nucleicos contra degradação e dessorção, a pré-complexação do lipídio catiônico com os ácidos nucleicos através de um método de preparação alternativo se torna interessante. O encapsulamento desses pré-complexos em um sistema nanoestruturado resulta em um aumento de sua estabilidade (FRAGA et al., 2015a), assim como poderia otimizar a biodistribuição em tecidos de maior dificuldade de acesso e aumentar a eficiência de transfecção dos complexos *in vivo*.

Outra consideração da terapia gênica é que a correção gênica em modelo animal murino adulto somente tem capacidade de promover a melhora clínica de alguns sintomas, enquanto teria pouco ou nenhum efeito em locais de difícil acesso, como as articulações, os ossos e o cérebro, que sofrem um dano permanente. Em vista dessas condições, existe a possibilidade de administração hidrodinâmica em camundongos neonatos (YAN et al., 2012), o que aumentaria a possibilidade de correção do defeito genético antes da manifestação dos sintomas da doença promovendo o aumento da produção vitalícia de IDUA, além da barreira hematoencefálica neonatal ainda não estar completamente formada (TOMATSU et al., 2016). A injeção hidrodinâmica é uma opção atraente para o direcionamento hepático de vetores não-virais contendo o gene de interesse. Essa técnica envolve uma injeção na veia temporal superficial de um grande volume - cerca de 10% do peso corporal - de formulação; é um método simples e confiável para a entrega de muitos agentes, e tem sido utilizada em transplantes de medula óssea, administração de compostos experimentais e tratamentos de terapia gênica (BONAMASSA; HAI; LIU, 2011; SUDA; LIU, 2007; YAN et al., 2012). Esse método tem apresentado maior expressão gênica principalmente no fígado devido a sua arquitetura única de direcionamento, e tem demonstrado que certos elementos reguladores podem levar a níveis mais elevados

de expressão gênica do que a administração intravenosa caudal (PRESTON; PELLEGRINI; EBERT, 2016; SEBESTYEN et al., 2006).

Outra limitação da terapia gênica não-viral é a curta duração da expressão gênica após a liberação do material genético na célula, especificamente de plasmídeos episomais (CARVALHO et al., 2015). A expressão estável de sequências de DNA recém introduzidas pode aumentar consideravelmente se ocorrer sua integração no genoma da célula hospedeira. Contudo, a integração raramente ocorre e, a fim de superar essa limitação, vários sistemas que promovem a integração dos genes terapêuticos ao genoma estão sendo desenvolvidos.

EDIÇÃO GÊNICA

A tecnologia de edição gênica baseia-se no reconhecimento de sequências genômicas e na utilização de nucleases a fim de modificar virtualmente qualquer gene alvo. Para isso, são utilizados sistemas de edição compostos por um domínio de ligação a sequências específicas de DNA unido a um domínio de clivagem de ácidos nucleicos (COX; PLATT; ZHANG, 2015).

Um primeiro passo crucial para a realização de edição gênica é a criação de uma quebra na fita dupla de DNA no locus genômico a ser modificado. A quebra induzida pela nuclease pode ser reparada por pelo menos um dos dois mecanismos de reparo: união de extremidades não homólogas (UENH, NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) e recombinação homóloga (RH, HDR, do inglês *homologous directed repair*) (SANDER; JOUNG, 2014a).

O reparo via UENH é realizado por enzimas que promovem a religação das fitas sem a utilização de um molde (Figura 1). É, portanto, um mecanismo sujeito a erros, já que normalmente alguns nucleotídeos são retirados ou adicionados à fita de DNA, causando mutações por inserção ou deleção (*indels*) de vários tamanhos, que mudam a leitura da sequência, alterando ou inativando a expressão correta do gene (SANDER; JOUNG, 2014b). Já o reparo por RH acontece quando um DNA exógeno complementar à sequência onde houve a quebra da fita dupla (doador) serve como molde para a reconstrução das fitas. É possível construir moldes de sequências doadoras com alterações de nucleotídeos, e essas alterações serão então

incorporadas ao DNA genômico. Esse mecanismo pode ser utilizado para introduzir ou corrigir mutações pontuais específicas ou para inserir sequências desejadas, desde que elas estejam flanqueadas por regiões homólogas ao lócus que se deseja alterar. Com a quebra da fita dupla de DNA induzida por nucleases, as frequências destas alterações são normalmente maiores do que 1% e, em alguns casos, chegam a mais de 50% (SANDER; JOUNG, 2014b)

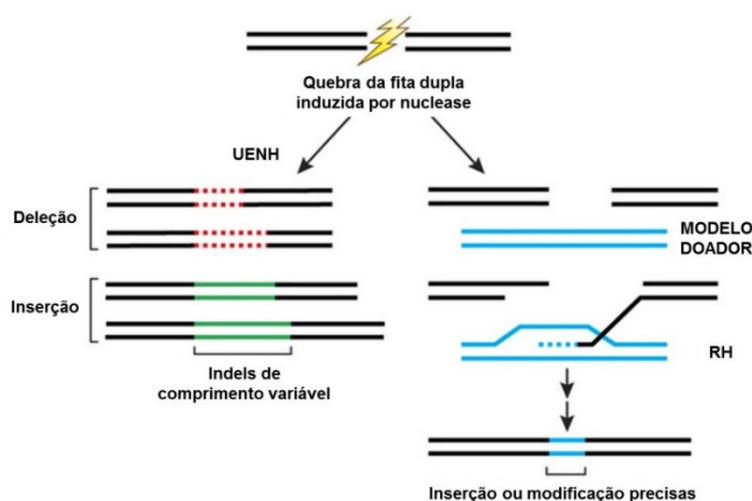


Figura 1. Edição gênica induzida por nuclease. A clivagem da fita dupla de DNA provocada pela nuclease está sujeita a duas formas de mecanismos de reparo: UENH ou RH. O reparo mediado por UENH pode resultar em inserções ou deleções de tamanhos variados no local da quebra do DNA. O reparo mediado por RH necessita da presença de uma sequência doadora modelo, que pode ser fita simples ou dupla, que servirá como molde e assim podem ser introduzidas mutações de ponto ou podem ser inseridas novas sequências (SANDER; JOUNG, 2014a).

Os primeiros sistemas utilizados para edição gênica foram enzimas quiméricas como as nucleases dedo de zinco (ZFN, do inglês *zinc finger nuclease*) e as nucleases efetoras do tipo ativadoras de transcrição (TALEN, do inglês *transcription activator-like effector nuclease*). Ambas têm um domínio proteico que se liga a sequências específicas de DNA fusionado à nuclease FokI, que cliva o DNA. Só recentemente começou a ser utilizada uma plataforma que é baseada em RNA, o sistema CRISPR/Cas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeat associated Cas*) (COX; PLATT; ZHANG, 2015).

A mais nova e promissora plataforma para edição gênica é o sistema CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (MALI et

al., 2013a), que provém de um sistema adaptativo de defesa de procaríotos, que usa sequências curtas de RNA para direcionar a degradação de ácidos nucleicos de fagos invasores e plasmídeos (Figura 2) (MALI et al., 2013a). O locus genômico CRISPR/Cas em bactérias é formado por um conjunto de genes que codificam as proteínas Cas, seguido por sequências repetidas (repetições) que separam sequências variáveis de genomas invasores inseridas no DNA bacteriano (protoespaçadores). Enquanto os genes Cas são traduzidos em proteínas, o arranjo com as repetições e os protoespaçadores é transcrito em um único RNA antes de ser processado em fragmentos curtos de RNAs CRISPR (crRNA). Cada crRNA hibridiza com um segundo RNA, chamado RNA CRISPR transativador (tracrRNA). Os dois RNAs formam o RNA guia (gRNA) que se liga à uma das proteínas Cas, a nuclease Cas9, e a direciona para clivar a fita dupla de DNA da sequência alvo do DNA invasor, complementar ao protoespaçador contido no gRNA. Entretanto, para que o espaçador consiga se ligar à sua sequência complementar, ela deve estar adjacente a uma sequência curta de 3 nucleotídeos formados por 5'NGG, chamado motivo adjacente ao protoespaçador (PAM, do inglês *protospacer adjacent motifs*) (JINEK et al., 2012; SANDER; JOUNG, 2014a).

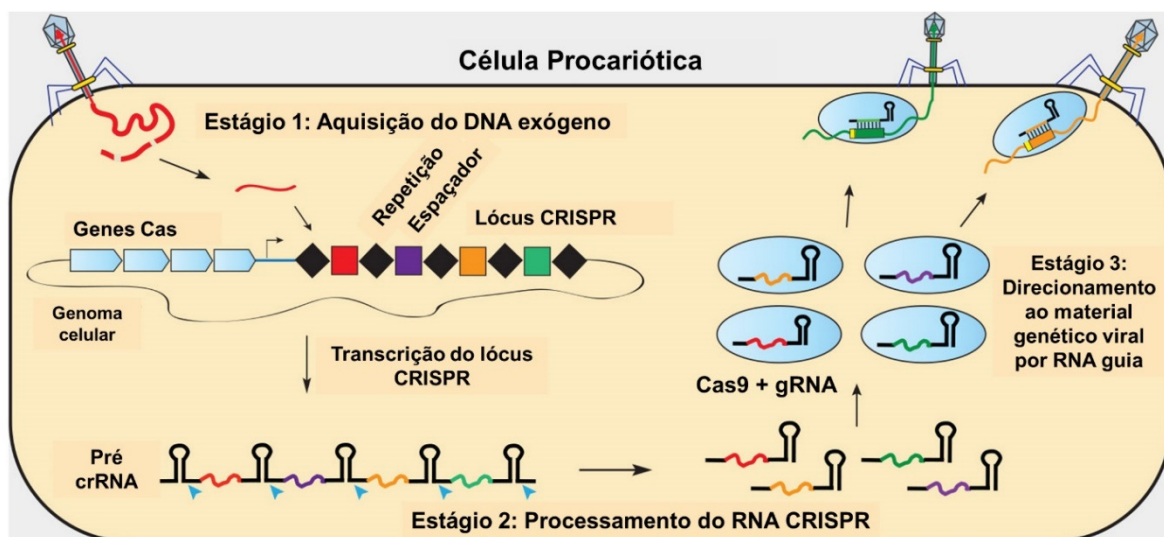


Figura 2. Sistema CRISPR/Cas9 em bactérias. Quando um DNA invasor entra na célula bacteriana, ele é incorporado ao genoma no locus CRISPR, que é então transcrito em um único RNA. Este é clivado e processado em crRNA, que hibridiza com tracrRNA para formar tracrRNA e se ligar à Cas9. O sistema então reconhece a sequência invasora, caso ela esteja adjacente a um PAM, por complementariedade com o gRNA, e a Cas cliva o DNA invasor, inativando-o (JINEK et al., 2012).

Em 2013 foi descrita uma nova versão dessa ferramenta aplicável a células de mamíferos, chamada sistema CRISPR/Cas9, que é composto por um RNA guia (gRNA) e pela nuclease Cas9 que formam um complexo gRNA/proteína para clivar sequências-alvo que pareiem com o gRNA e possuam a sequência PAM adjacente (Figura 3) (CONG et al., 2013; JINEK et al., 2012, 2013; MALI et al., 2013b).

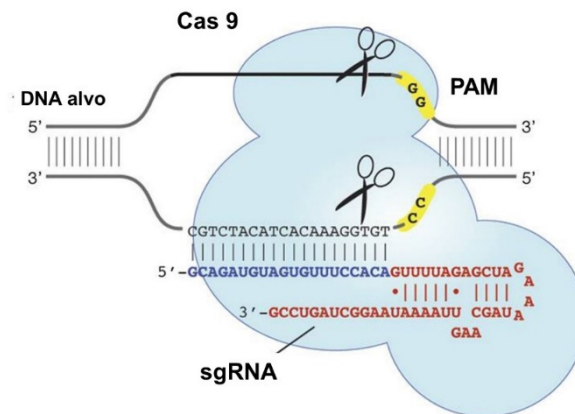


Figura 3. Ferramenta CRISPR/Cas9 para edição gênica. O sistema é composto por um RNA guia (sgRNA) e pela nuclease Cas9 que formam um complexo gRNA/proteína para clivar sequências no DNA alvo que pareiem com o gRNA e possuam a sequência de reconhecimento PAM.

O sistema pode ser utilizado por transfecção simples de um plasmídeo de expressão de gRNA e de Cas9 humanizado em células mamíferas (Figura 4), transformando-se numa ferramenta promissora para várias aplicações (CARVALHO et al., 2015; CONG et al., 2013; MALI et al., 2013b; VAN DER OOST et al., 2014).

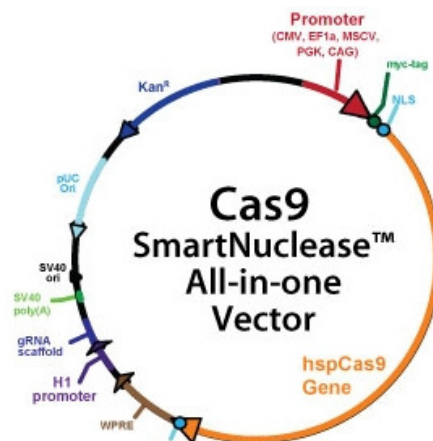


Figura 4. Plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 comercializado pela empresa System Biosciences (USA).

Apesar do vasto número de aplicações descritas como edição e correção gênica em linhagens celulares ou em modelo animal (CARVALHO et al., 2015), nenhum estudo até o momento reportou o uso destas CRISPR/Cas9 em mucopolissacaridoses ou qualquer DL. A possibilidade de correção de células-tronco de pacientes com MPS I com esta tecnologia permitiria que um transplante autólogo fosse realizado, promovendo uma alternativa terapêutica mais segura. Além disso, a edição genômica *in vivo* permitiria uma correção em longo prazo, reduzindo a necessidade do uso da TRE por esses pacientes. Como o uso do sistema CRISPR/Cas9 ainda é incipiente, não existem protocolos destinados ao desenvolvimento de formulações visando à vetorização desse plasmídeo, o que é essencial para aumentar a eficiência do sistema (GUAN et al., 2016; PAQUET et al., 2016).

Com base nessas considerações, espera-se viabilizar a produção da enzima deficiente através da edição gênica de fibroblastos de pacientes MPS I e através da administração hidrodinâmica de vetores lipídicos para o sistema CRISPR/Cas9 em camundongos MPS I neonatos, visando aumentar as chances de sucesso do tratamento da MPS I.

REFERÊNCIAS

- BALDO, G. et al. Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human mucopolysaccharidosis type I cells. **Cells, tissues, organs**, v. 195, n. 4, p. 323–329, 2012.
- BONAMASSA, B.; HAI, L.; LIU, D. Hydrodynamic Gene Delivery and Its Applications in Pharmaceutical Research. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 4, p. 694–701, 2011.
- BONDÌ, M. L.; CRAPARO, E. F. Solid lipid nanoparticles for applications in gene therapy: a review of the state of the art. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 1, p. 7–18, 2010.
- BRUXEL, F. et al. Investigation of the structural organization of cationic nanoemulsion/antisense oligonucleotide complexes. **Colloids and surfaces B, Biointerfaces**, v. 112, p. 530–536, 2013.
- CARVALHO, T. G. et al. Genome Editing: Potential Treatment for Lysosomal Storage Diseases. **Current Stem Cell Reports**, v. 1, n. 1, p. 9–15, 2015.
- CLARKE, L. A. et al. Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidoses I. **Pediatrics**, v. 123, 2009.
- CONG, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013.
- COUTINHO, M. F.; SANTOS, J. I.; ALVES, S. Less Is More: Substrate Reduction Therapy for Lysosomal Storage Disorders. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 7, 2016.
- COX, D. B. T.; PLATT, R. J.; ZHANG, F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. **Nature Medicine**, v. 21, n. 2, p. 121–131, fev. 2015.
- DICKSON, P. I. et al. Safety of laronidase delivered into the spinal canal for treatment of cervical stenosis in mucopolysaccharidosis I. **Molecular genetics and metabolism**, v. 116, n. 1–2, p. 69–74, 2015.
- FOUST, K. D. et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 59–65, 2009.
- FRAGA, M. et al. Evaluation of the toxicity of oligonucleotide/cationic nanoemulsion complexes on Hep G2 cells through MTT assay. **Die Pharmazie**, v. 63, n. 9, p. 667–670, 2008.
- FRAGA, M. et al. Influence of phospholipid composition on cationic emulsions/DNA complexes: physicochemical properties, cytotoxicity, and transfection on Hep G2 cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2213–2220, 2011.
- FRAGA, M. et al. PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 37–46, 2015a.

FRAGA, M. et al. Cationic Nanoemulsions as a Gene Delivery System: Proof of Concept in the Mucopolysaccharidosis I Murine Model. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 810–816, 2015b.

FRAGA, M. et al. Factors influencing transfection efficiency of pIDUA/nanoemulsion complexes in a mucopolysaccharidosis type I murine model. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 2061–2067, 2017.

FULLER, M.; MEIKLE, P. J.; HOPWOOD, J. J. Glycosaminoglycan degradation fragments in mucopolysaccharidosis I. **Glycobiology**, v. 14, n. 5, p. 443–450, 2004.

GIUGLIANI, R. et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 589–604, 2010.

GIUGLIANI, R. Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 35, n. 5, p. 871–877, 2012a.

GIUGLIANI, R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 924–931, 2012b.

GIUGLIANI, R. Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 35, n. 5, p. 871–877, 2012c.

GIUGLIANI, R. et al. Emerging treatment options for the mucopolysaccharidoses. **Research and Reports in Endocrine Disorders**, v. 2, p. 53–64, 2012.

GUAN, Y. et al. CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse. **EMBO molecular medicine**, v. 8, n. 5, p. 477–488, 2016.

HARTUNG, S. D. et al. Enzymatic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts by adeno-associated virus-mediated transduction of the alpha-L-iduronidase gene. **Human gene therapy**, v. 10, n. 13, p. 2163–2172, set. 1999.

JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012.

JINEK, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. **eLife**, v. 2, p. e00471, 29 jan. 2013.

KAY, M. A. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 316–328, 2011.

KIM, S. H. et al. PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 2 SPEC. ISS., p. 123–129, 2006.

KREUTER, J. et al. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. **Journal of drug targeting**, v. 10, n. 4, p. 317–325, 2002.

KWON, S. M. et al. In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 128, n. 1, p. 89–97, 2008.

LAVIGNE, M. D.; GÓRECKI, D. C. Emerging vectors and targeting methods for nonviral gene therapy. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 11, n. 3, p. 541–557, 1 set. 2006.

LIU, C.-H.; YU, S.-Y. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 79, n. 2, p. 509–515, set. 2010.

LUND, T. C. Hematopoietic stem cell transplant for lysosomal storage diseases. **Pediatric endocrinology reviews : PER**, v. 11 Suppl 1, p. 91–98, nov. 2013.

LV, H. et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 100–109, 2006.

MALI, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 2013a.

MALI, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 2013b.

MATTE, U. et al. Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 78, n. 1, p. 37–43, 2003.

MEIKLE, P. J.; FULLER, M.; HOPWOOD, J. J. Lysosomal degradation of heparin and heparan sulfate. In: GARG, H. G.; LINHARDT, R. J.; HALES, C. A. (Eds.). . **Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate**. 1. ed. London: Elsevier Ltd., 2011. p. 792.

MORILLE, M. et al. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. **Biomaterials**, v. 29, n. 24–25, p. 3477–96, 2008.

MUENZER, J. Overview of the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 50 Suppl 5, p. v4-12, dez. 2011.

MUENZER, J.; WRAITH, J. E.; CLARKE, L. A. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. **Pediatrics**, v. 123, 2009.

NAM, H. Y. et al. Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers. **Archives of pharmacal research**, v. 32, n. 5, p. 639–646, 2009.

NORDLING-DAVID, M. M.; GOLOMB, G. Gene Delivery by Liposomes. **Israel Journal of Chemistry**, v. 53, n. 9–10, SI, p. 737–747, 2013.

PAQUET, D. et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. **Nature**, v. 533, p. 125–129, 2016.

PARENTI, G.; ANDRIA, G.; BALLABIO, A. Lysosomal storage diseases: from

- pathophysiology to therapy. **Annual review of medicine**, v. 66, p. 471–486, 2015.
- PRESTON, S. P.; PELLEGRINI, M.; EBERT, G. Hydrodynamic Injection as a Method of Gene Delivery in Mice: A Model of Chronic Hepatitis B Virus Infection. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1419, p. 109–115, 2016.
- REPNIK, U. et al. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1824, n. 1, p. 22–33, jan. 2012.
- SAFTIG, P.; HAAS, A. Turn up the lysosome. **Nature cell biology**, v. 18, n. 10, p. 1025–1027, set. 2016.
- SAFTIG, P.; KLUMPERMAN, J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 9, p. 623–635, set. 2009.
- SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347–55, 2014a.
- SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347–355, abr. 2014b.
- SCHUH, R. S.; BRUXEL, F.; TEIXEIRA, H. F. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. **Química Nova**, v. 37, p. 1193–1198, 2014.
- SCOTT, H. S. et al. Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene. **Genomics**, v. 13, n. 4, p. 1311–1313, ago. 1992.
- SEBESTYEN, M. G. et al. Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. **The journal of gene medicine**, v. 8, n. 7, p. 852–873, 2006.
- SUDA, T.; LIU, D. Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications. **Molecular Therapy**, v. 15, n. 12, p. 2063–2069, 2 out. 2007.
- TOMANIN, R. et al. Gene therapy approaches for lysosomal storage disorders, a good model for the treatment of mendelian diseases. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)**, v. 101, n. 7, p. 692–701, jul. 2012.
- TOMATSU, S. et al. Neonatal cellular and gene therapies for mucopolysaccharidoses: the earlier the better? **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 39, p. 189–202, 17 nov. 2016.
- VAN DER OOST, J. et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 479–492, 2014.
- VERA, M. et al. Immune response to intrathecal enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I patients. **Pediatric research**, v. 74, n. 6, p. 712–720, dez. 2013.

VERISSIMO, L. M. et al. Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy. **Journal of drug targeting**, v. 18, n. 5, p. 333–342, 2010.

YAN, S. et al. High levels of gene expression in the hepatocytes of adult mice, neonatal mice and tree shrews via retro-orbital sinus hydrodynamic injections of naked plasmid DNA. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 3, p. 763–771, 2012.

YIN, H. et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 8, p. 541–545, 2014.

1.1. INTRODUÇÃO

O primeiro capítulo deste trabalho é um artigo científico de revisão sobre as aplicações da nanotecnologia no tratamento das MPS. Os tratamentos atualmente disponíveis não são totalmente eficazes, e novas alternativas são necessárias. Nesse contexto, a busca de novos biomateriais e ferramentas para o tratamento das doenças genéticas é um desafio constante no campo farmacêutico. Novos tratamentos promissores incluem o uso da nanotecnologia como sistemas carreadores de ácidos nucleicos e de enzimas recombinantes. Esses sistemas podem ser micelas, lipossomas, nanopartículas ou nanoemulsões, normalmente compostos de materiais catiônicos, que podem ser poliméricos ou lipídicos. A escolha do biomaterial que compõe essas nanoestruturas deve focar na eficiência, biossegurança e toxicidade. Uma alternativa para a utilização da nanotecnologia no tratamento da MPS, seria a nano encapsulação de enzimas, que inclusive poderia superar algumas das limitações da ERT, tais como a incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e a reduzida biodistribuição tecidual. Outro tratamento que poderia se beneficiar do uso da nanotecnologia, é a terapia gênica, cujo principal desafio é o desenvolvimento de um vetor estável e seguro que possa entregar o material genético com a eficiência de transfecção dos vetores virais. Neste artigo, o objetivo é discutir novas abordagens de tratamento para as MPS, mais especificamente, sistemas nanotecnológicos carreadores de enzima e ácidos nucleicos, juntamente com os biomateriais disponíveis para construir as nanoestruturas, demonstrando suas aplicações em estudos recentes.

1.2. ARTIGO CIENTÍFICO

Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses

Publicado no Expert Opinion on Drug Delivery, 2016

NANOTECHNOLOGY APPLIED TO TREATMENT OF MUCOPOLYSACCHARIDOSES

Roselena S. Schuh¹, Guilherme Baldo^{2,#}, Helder F. Teixeira¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, Departamento de Fisiologia, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Guilherme Baldo

E-mail: gbaldo@hcpa.edu.br

Telephone: +55 51 33598838

Nanotechnology Applied to Treatment of Mucopolysaccharidoses

Introduction: Mucopolysaccharidoses (MPS) are genetic disorders caused by the accumulation of glycosaminoglycans (GAGs) due to deficiencies in the lysosomal enzymes responsible for their catabolism. Current treatments are not fully effective and are not available for all MPS types. Accordingly, researchers have tested novel therapies for MPS, including nanotechnology-based enzyme delivery systems and gene therapy. In this review, we aim to analyze some of the approaches involving nanotechnology as alternative treatments for MPS.

Areas covered: In this review, we analyze nanotechnology-based systems, focusing on the biomaterials, such as polymers and lipids, that comprise these nanostructures, and we have highlighted studies that describe their use as enzyme and gene delivery systems for the treatment of MPS diseases.

Expert opinion: Some protocols, such as the use of polymer-based systems or nanostructured carriers associated with enzymes and nanotechnology-based carriers for gene therapy, along with combined approaches, seem to be the future of MPS therapy.

Keywords: enzyme delivery system, gene therapy, lysosomal storage disorders, mucopolysaccharidoses, nanotechnology.

INTRODUCTION

Mucopolysaccharidoses (MPS) are a group of rare genetic lysosomal storage diseases caused by deficiencies of enzymes involved in the catabolism of glycosaminoglycans (GAGs). The lack of enzymes causes GAGs accumulation in the lysosomes, resulting in generalized cell, tissue, and organ dysfunctions [1]. The treatments currently available for MPS hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and enzyme replacement therapy (ERT) are not fully effective, and new alternatives are needed.

The search for new biomaterials and tools for the treatment of genetic diseases is a constant challenge in the pharmaceutical field. New promising treatments include the use of nanotechnology as enzyme and nucleic acid delivery systems. The possibility of enhancing the therapeutic response through higher delivery rates creates an alternative to current MPS treatments. The development of safe and efficient systems for enzyme and gene delivery targeting MPS are needed to improve clinical outcomes. These systems can be micelles, liposomes, nanoparticles or nanoemulsions that are composed of cationic materials, polymers or lipids. The biomaterial choice must focus on efficiency, safety and toxicity, and they should preferably be biocompatible, biodegradable, and bioabsorbable. Especially in the case of gene therapy, the choice of the biomaterial also depends on its charge, as positively charged groups interact with negatively charged nucleic acids through electrostatic interactions. When the biomaterial is a cationic polymer, the electrostatic interactions with nucleic acids form complexes called polyplexes, while the interaction of cationic lipids with nucleic acids form lipoplexes.

Enzyme nanoencapsulation could overcome some of the limitations of enzyme replacement therapy (ERT) for treating MPS, such as the inability to cross the blood-brain barrier (BBB) and the blood-retinal barrier (BRB), along with the low tissue biodistribution [2,3].

In the case of gene therapy, the main advantages of nanotechnology-based systems over viral vectors are their low immunogenicity, large-scale manufacture, and capacity to carry large nucleic acid molecules [4]. Currently, the main challenge in non-viral gene therapy is the development of a stable and safe vector that can complex

with and deliver foreign genetic material into specific cell types with the transfection efficiency of viral vectors.

In this article, our goal is to discuss new treatment approaches for MPS, more specifically, enzyme delivery and gene therapy, based on nanotechnology, along with the biomaterials available to build the nanostructures, highlighting some promising candidates for clinical applications.

NANOTECHNOLOGY-BASED SYSTEMS

Nanotechnology-based systems have attracted attention because of their ability to overcome the limitations of both gene therapy and the direct administration of drugs and proteins. Of course, the effectiveness of a system to promote biological activity with low toxicity depends not only on the structure of the system but also on the composition of the biomaterials. Thus, some lipid (liposomes and nanoemulsions) and polymeric (nanocapsules and nanospheres) systems have been proposed. The main characteristics required for carriers and for their constituent materials are biodegradability, bioabsorbability, biocompatibility, and stability. These systems should also be able to protect the genetic material and proteins, transfect target cells, and have an accessible cost of production [5]. Figure 1.1 shows the structures of the most common nanotechnology-based systems.

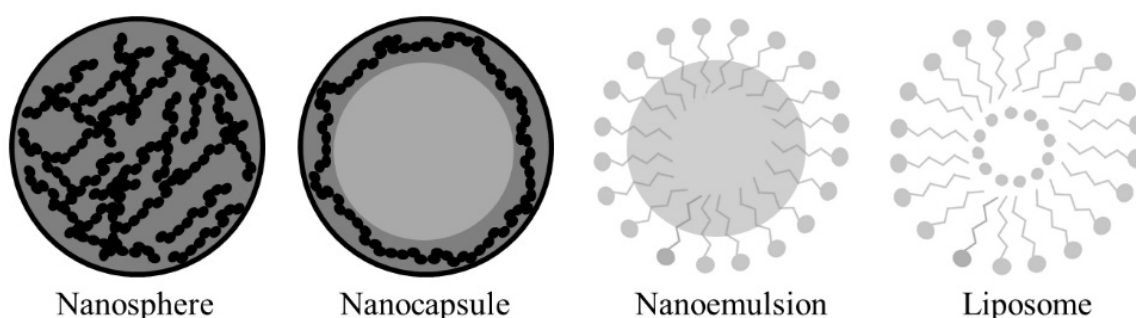


Figure 1.1. Nanostructures of nanotechnology-based polymeric and lipid systems.

Among the lipid systems, liposomes and nanoemulsions are the most commonly used. Liposomes are lipid vesicles composed mainly of phospholipids, although other compounds employed may be of lipid or polymeric nature. Genetic material and proteins may be adsorbed on the surface of the liposome or inside its cavity, and the encapsulation rate is dependent on the method of preparation.[6] Liposomes are capable of increasing the stability of nucleic acids and proteins, reducing their rate of hydrolysis and thus prolonging their half-life [6].

A nanoemulsion preparation consists of a liquid-liquid dispersion of two immiscible liquids stabilized by surfactants [7]. Depending upon the ratio of the constituents, they form either a water-in-oil (W / O) or an oil-in-water emulsion (O / W), the latter being more relevant for protein delivery and gene therapy [8]. Thus, due to the high lipophilicity of the O / W nanoemulsion internal phase, the association of protein and genetic material generally takes place by adsorption on the droplet surface. In the same way as for liposomes, it is usually necessary to use positively charged molecules in the composition, generally cationic lipids. The basic constituents of a nanoemulsion aiming at protein and gene delivery would be an oil, surfactant and cationic lipid.

Nanoparticles generally comprise polymers, lipids or a combination of both. Depending on the constituents and preparation method, proteins and genetic material can be associated within the structure or adsorbed on the surface [9]. When these systems contain a polymer (usually water-insoluble), the term nanoparticle can refer to both a core structure that is completely polymeric (nanosphere) and one with an oil core (nanocapsule). Nanoparticles obtained from primarily hydrophilic polymers allow the association of hydrophilic molecules, such as proteins and genetic material, in the interior of the particle, which offers greater protection from degradation [10].

Table 1.1 shows the main advantages, disadvantages, and possible applications of nanostructures.

Table 1.1. Nanostructures: advantages, disadvantages, and references of applications.

Nature	Nanostructure	Advantages	Disadvantages	Ref.
Lipid	Nanoemulsion	Bioabsorbability; High drug loading capacity;	Storage stability; Aggregation into larger droplets;	[23]
	Liposome	Hydrophilic and lipophilic drug loading; Functionalization	Manufacture	[94]
Polymeric	Nanocapsule	Storage stability; Lyophilization	Scarcity of safe polymers with regulatory approval; Manufacture;	[25]
	Nanosphere		Price	[36]

BIOMATERIALS USED IN NANOTECHNOLOGY-BASED SYSTEMS

The main characteristics of nanostructures depend on the choice of biomaterials. Gene therapy and enzyme delivery require multiple attributes, including the association of molecules, transfection, functionalization (surface modification), and safety. A biomaterial can be functionalized by binding of molecules onto its surface. Functionalization with receptor-binding molecules promotes receptor-specific targeting ability. These are the reasons why knowledge of biomaterials is imperative.

The most common biomaterials used in gene therapy and enzyme delivery are described ahead, and Table 1.2 shows a brief summary of the biomaterials' advantages and disadvantages and references to their applications.

Table 1.2. Biomaterials: advantages, disadvantages, and references of applications.

	Biomaterial	Advantages	Disadvantages	Ref.	
Lipids	<i>Phospholipids</i>	Lecithin	Safe for IV administration; increase stability	Reduced protein/nucleic acid loading capacity; neutralization of cationic charge	[25]
		DOPE DSPC	Fusogenic property; increase transfection; no interference with global charge of nanostructures	Excess may lead to instability and lower transfection efficiency	[22]
	<i>Cationic lipids</i>	DOTAP DOTMA DDAB	Form complexes with proteins/nucleic acids; prevent degradation of molecules	Cytotoxicity (which can be neutralized by complexation with proteins/nucleic acids)	[23]
		<i>Oils</i>	LCT MCT	Low immunogenicity; biocompatibility; biodegradability; bioabsorbability	Stability, lipoperoxidation can occur
	<i>Surfactants</i>	Span® Tween®	Increase stability; inhibit aggregation; reduce droplet size; form a steric barrier with respect to serum proteins	Hemolytic reactions and toxicity limit their use as single components	[25]
	<i>Other lipids</i>	DSPE-PEG	Increase stability; increase half-life in bloodstream; form a barrier to electrostatic interactions	Excess may decrease transfection efficiency because it could reduce interaction with cells	[94]
Polymers	<i>Neutral polymers</i>	PLGA PLA PGA	Biodegradability; biocompatibility; well-described formulation and production; confer drug protection from degradation; controlled release	Negative effect on protein and nucleic acid stability during preparation and storage, primarily due to the acid-catalyzed degradation	[34]
		PCL	Biodegradability; biocompatibility; slow degradation; long-term delivery extending over one year	Particle-particle aggregation makes physical handling difficult in liquid and dry forms	[25]
		PBCA	Forms small sized nanoparticles; efficient accumulation in target tissues	Low toxicity, although toxicity of degradation products is not fully elucidated	[36]
	<i>Cationic polymers</i>	Chitosan	Widely used in pharmaceutical area; biodegradability; biocompatibility; associates proteins/nucleic acids	Positively charged, thus reacts with many negatively charged surfaces/polymers	[25]

DOPE: 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; DSPC: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOTAP: N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium; DOTMA: N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium; DDAB: Didecyltrimethylammonium bromide; LCT: Long-chain triglycerides; MCT: Medium-chain triglycerides; DSPE-PEG: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol; PLGA: Polylactic co-glycolic acid; PLA: Polylactic acid; PGA: Polyglycolic acid; PCL: Poly-ε-caprolactone; PBCA: Polybutyl cyanoacrylate.

Lipids

Lipids are biomaterials used in protein and nucleic acid delivery systems due to their biocompatibility with the cytoplasmic membrane, biodegradability, and bioabsorbability [11].

For lipofection, the advantages are the capability of loading long nucleic acid sequences when compared to size limitation of some viral vectors, protection against degradation, low immunogenicity, and easy manufacture [12,13]. The disadvantages include low target selectivity and low transfection efficiency when compared to viral vectors. These limitations may currently be circumvented by surface functionalization aimed at cell receptor mediated endocytosis, by inhibiting lysosomal digestion, or even targeting to the cell nucleus [12]. There are nanomedicines approved for clinical use based on liposomes, including liposomal doxorubicin, and irinotecan liposome injection. The administration of these compounds through the intravascular route indicates that these lipids are safe for human use [14].

The lipids most commonly used in formulations for protein and nucleic acid delivery are phospholipids, cationic lipids, oils, and surfactants. The nanotechnology-based systems applied to treat MPS use some of these compounds, as briefly explained ahead.

Phospholipids

Phospholipids consist of one hydrophilic polar head and two hydrophobic nonpolar tails, and they are major constituents of biological membranes [8].

Lecithin / phosphatidylcholine (PC) is a mixture of phospholipids used in the manufacture of liposomes and nanoemulsions, and is commonly derived from egg or soy. Its major advantages are the feasibility of parenteral administration in humans, low occurrence of adverse events, and stability [8,12,15]. One disadvantage of lecithin is its limited protein and nucleic acid loading capacity, due to the partial neutralization of the cationic lipids by its negatively charged phospholipids [16].

Other phospholipids, such as DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) and DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), have a fusogenic property, which facilitates transfection from the endosome to the cytosol [17]. Another advantage is their neutral charge, which does not interfere with the global charge of nanostructures. Among their disadvantages is the need for the optimization of the proportion of fusogenic lipids in the formulation, because an excess may lead to instability and consequently to a lower transfection efficiency [18].

Cationic lipids

Among cationic lipid systems, cationic nanoemulsions and liposomes have been considered as potential systems for protein and nucleic acid delivery [19,20]. A cationic material is indispensable to associate genetic material in non-viral gene therapy [21]. DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium) is the most commonly used cationic lipid because it presents biodegradable ester bond linkages, and shows improved transfection efficiency [18,22,23].

Lipids, such as DC-Chol (3-Beta-[N-(dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol), DOTAP, DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium), and DDAB (Didecyldimethylammonium bromide), allow nanostructures to effectively be used to carry a variety of molecules, such as oligonucleotides, DNA plasmids, and proteins for the treatment of MPS [22,23]. They also compact high molecular weight nucleic acids, improve the stability, and prevent the degradation of molecules. However, their use in biological studies is often limited due to their positive charge, which interacts with cell membranes and leads to cytotoxicity. The toxicity can be reduced by complexation with nucleic acids or proteins, since their negatively charged groups neutralize the positive charge of cationic lipids [24].

Oils and surfactants

Oils are liquid mixtures of lipids of varying composition at room temperature. Long-chain triglycerides (LCT) and medium-chain triglycerides (MCT) are the most common oils used in pharmaceutical formulations approved for parenteral administration [22,23,25,26]. Both LCT and MCT are commonly used in

nanoemulsions due to their low immunogenicity, biocompatibility, biodegradability, and bioabsorbability. As a drawback, lipoperoxidation can occur when intravenously administered.

Surfactants are amphiphilic compounds that reduce the interfacial tension between two immiscible liquids or between a liquid and a solid. Surfactants may act as emulsifiers in the case of nanostructures. Nonionic surfactants in combination with phospholipids lead to the formation of a compact mixed film, adding stability to formulations [45]. The addition of Span[®] (sorbitan monostearate), Tween[®] (polysorbate), or derivatives of polyethylene glycol (PEG) covalently linked to phosphatidylethanolamine, may result in prolonged circulation in the bloodstream and lower biodistribution, which may be attributed to the steric barrier formed by these polymers with respect to serum proteins [26,27]. The steric shielding or steric barrier occurs because the positively charged groups on the nanostructure are seemingly weakened or spatially shielded by less charged or oppositely charged molecules, thus controlling the interactions with the blood proteins.

The major advantages of surfactants are their increased stability, inhibition of aggregation, and reduction of droplet size. Some of them, like Tween[®] 80, are suitable for parenteral use. As a drawback, hemolytic reactions and toxicity could limit their use as single components [26].

Other lipids

It is a known fact that hydrophilic polymers, such as PEG chains, coating the surface of a liposome can increase its stability and half-life in the bloodstream. PEGylated lipids act as a barrier to electrostatic interactions and can reduce the effect of the ionic strength of body fluids on the stability of vesicles. For this reason, PEGylated liposomes called “stealth” are of great interest, because of their ability to evade interception by the immune system, reduce *in vivo* recognition, and phagocytic uptake. The use of DSPE-PEG (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol) in the development of liposomes and nanoemulsions has been proposed for various labile molecules, such as proteins, oligonucleotides, and plasmids [23,28,29]. Such approaches could improve the transfection efficiency in organs of

difficult access, which is critical for the treatment of multisystemic disorders, such as MPS.

The presence of DSPE-PEG in formulations is capable of reducing or even abolishing toxicity [30]. However, an excess can decrease the transfection efficiency because it could prevent the access of complexes to cells as well as their escape from endosomes [31].

POLYMERS

Polymers are another significant molecular group of biomaterials [5,32]. Due to their biodegradability and biocompatibility, polymers derived from polylactic acid (PLA) and polyglycolic acid (PGA), such as PLGA (polylactic co-glycolic acid) have been used in nanoparticles to encapsulate macromolecules [33]. The FDA and European Medicine Agency have approved PLGA for parenteral administration. It also has a well-described formulation and method of production, protects the drug from degradation, and enables controlled release. It also allows the possibility of increased half-life in the bloodstream, and targeting to specific organs or cells [34]. Enzyme encapsulation with PEG–PLGA (Polyethylene glycol–poly lactic co-glycolic acid) enables enzyme delivery to the endothelium and provides sustained protection against vascular oxidative stress and external proteolysis [35]. One important drawback of PLGA is its negative effect on protein and nucleic acid stability during preparation and storage, primarily due to the acid-catalyzed nature of its degradation.

Polybutyl cyanoacrylate (PBCA) nanoparticles coated with polysorbate 80 have been showed to be an attractive and innovative carrier for brain targeting [36,37]. Because the nanoparticles are small, they penetrate into small capillaries and can be taken up by cells, allowing efficient accumulation in target tissues. Nanoparticles prepared with biodegradable polymers, such as PBCA, are less toxic, but the toxicity of the degradation products, especially in the brain, has not been fully elucidated.

Poly- ϵ -caprolactone (PCL) is a biodegradable and biocompatible polymer. Due to its slow degradation, PCL is ideally suited for long-term delivery. This has led to its application in the preparation of different delivery systems, such as microspheres, nanospheres, and implants [38]. The advantages of PCL include its high permeability

to small molecules, an ability to form blends with other polymers, and slow degradation, making it suitable for long-term delivery systems extending over a period of more than one year. However, particle-particle aggregation makes the physical handling of nanoparticles difficult in both liquid and dry forms [38,39].

Cationic Polymers

Naturally occurring polymers, especially polysaccharides, such as chitosan and alginate, have been extensively researched as materials for carriers of therapeutic protein molecules and nucleic acids [40]. Chitosan is a linear heteropolymer that is mainly derived from the deacetylation of chitin in basic medium, and is composed of repeating units of N-glucosamine and N-acetylglucosamine. Chitosan has been widely used in pharmaceutical and medical areas due to its favorable biological properties, including its biodegradability and biocompatibility [40]. Due to the easy availability of free amino groups in chitosan, it carries a positive charge and thus, reacts with many negatively charged surfaces/polymers [41]. However, its ability to interact with proteins and genetic material makes its expanded use very attractive.

MUCOPOLYSACCHARIDOSES

MPS are 11 chronic and progressive rare inherited autosomal recessive (except X-linked recessive MPS II) lysosomal storage diseases caused by deficiencies of enzymes responsible for the catabolism of GAGs. GAGs that are not degraded or are only partially degraded by alternative routes accumulate in the lysosomes, resulting in generalized cell, tissue, and organ dysfunctions that appear as coarse faces, organomegaly, skeletal disorders, and cognitive impairment in some disorders [1]. Table 1.3 describes the enzyme, gene, and GAGs involved in each MPS. Most MPS display a varying phenotype from attenuated to severe, which generally correlates with mutations and the level of enzyme activity [42].

Table 1.3. Enzyme, gene, and GAGs involved in each MPS.

Disease	Gene	Enzyme	GAGs
MPS I	<i>IDUA</i>	Alpha-L-iduronidase	Heparan sulfate Dermatan sulfate
MPS II	<i>IDS</i>	Iduronate sulfatase	Heparan sulfate Dermatan sulfate
MPS IIIA	<i>SGSH</i>	Heparan N-sulfatase (sulfamidase)	Heparan sulfate
MPS IIIB	<i>NAGLU</i>	Alpha-N-acetyl-glucosaminidase	Heparan sulfate
MPS IIIC	<i>HGSNAT</i>	Acetyl-CoA: alpha-glucosaminide acetyltransferase	Heparan sulfate
MPS IIID	<i>GNS</i>	N-acetylglucosamine 6-sulfatase	Heparan sulfate
MPS IVA	<i>GALNS</i>	Galactose 6-sulfatase	Keratan sulfate Chondroitin sulfate
MPS IVB	<i>GLB1</i>	Beta-galactosidase	Keratan sulfate
MPS VI	<i>ARSB</i>	N-acetyl-galactosamine 4-sulfatase	Dermatan sulfate Chondroitin sulfate
MPS VII	<i>GUSB</i>	Beta-glucuronidase	Heparan sulfate Dermatan sulfate Chondroitin sulfate
MPS IX	<i>HYAL1</i>	Hyaluronidase	Hyaluronan

MPS: Mucopolysaccharidosis.

Although currently none of the MPS have a curative therapy, hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and enzyme replacement therapy (ERT) are available for some of these disorders. These treatments are based on the internalization of lysosomal enzymes by deficient cells through mannose-6-phosphate (M6P) receptors. After internalization, the enzyme is transported by endosomes into the lysosome, resulting in the catabolism of accumulated GAGs [43].

Both treatments improve several parameters in MPS patients, but some organs, such as bones, heart valves and, in the case of ERT, the brain, have limited or no improvements after therapy. Early treatment seems to be more efficient, as no reversal of the disease symptoms in tissues such as the brain and bones are expected, and therefore patients may benefit from early diagnosis and newborn screening [44].

In HSCT, the transplanted stem cells from bone marrow or umbilical cord blood produce and distribute the enzyme to several tissues through the reconstitution of the hematopoietic system [45]. HSCT may prolong the patient's life, preserve neurocognition, and enhance somatic changes. However, due to risks associated with the therapy, such as the morbidity and mortality caused by graft-versus-host disease, the difficulty of finding HLA (human leukocyte antigen) compatible donors, and the development of chimerism, this treatment was historically limited [46,47]. A recent study reports the survival and graft outcomes of 62 MPS I, II, III and VI patients receiving HSCT according to new international HSCT guidelines in two European centers of expertise, and showed high overall survival (95.2%).[47] HSCT has been attempted in MPS I, II, IIIA, IIIB, IVA, VI, and VII. However it is currently recommended only for Hurler syndrome (the severe form of MPS I). In this disease the therapy is effective in preventing brain abnormalities as well as most peripheral manifestations, excepting a few organs such as the bone and the eye [47–52].

ERT consists of weekly intravenous administrations of a recombinant version of the human enzyme produced by genetic engineering, and it is available for several MPS types (Table 1.4). It is not curative, but when ERT is initiated early, there is an improved outcome including the attenuated form of MPS I [53]. This approach can modify the disease's natural outcome of the attenuated form of MPS type I. Despite ERT being safe and beneficial, it has limited access to certain tissues, such as skeletal and neurological because it cannot cross the BBB. Additionally, the high cost per patient and the development of antibodies against the enzyme in some patients justify the search for new strategies for treating MPS [2,54–56].

Table 1.4. Recombinant enzymes available for MPS diseases.

Disease	Recombinant Enzyme	Brand name	Company
MPS I	Laronidase	Aldurazyme®	Biomarin Pharmaceuticals/ Genzyme Corporation
MPS II	Idursulfase alpha	Elaprase®	Shire Human Genetic Therapies
MPS IVA	Elosulfase alpha	Vimizim®	Biomarin Pharmaceuticals
MPS VI	Galsulfase	Naglazyme®	Biomarin Pharmaceuticals

MPS: Mucopolysaccharidosis.

The current therapeutic options for MPS are not entirely satisfactory because of limited effectiveness for many clinical features. Accordingly, researchers have tried novel therapies, including new enzyme delivery systems and gene therapy. These delivery systems aim to enhance therapeutic results, as they may allow the enzyme to reach limited-access organs and tissues. Gene therapy could potentially promote constant enzyme delivery directly to the target organs and could eliminate the need for ERT. Lysosomal storage diseases, such as MPS, are excellent candidates for gene therapy because they are caused by deficiencies in single genes, and the level of residual enzymatic activity required to correct GAG metabolism in fibroblast is low, about 2-5% of normal [57]. Additionally, a low number of modified cells is needed to ameliorate the phenotype, as one corrected cell can produce and release the lysosomal enzyme that is subsequently taken up by neighboring cells [58].

ENZYME DELIVERY FOR MPS AND NANOTECHNOLOGY

ERT for MPS is based on the endocytic internalization of lysosomal enzymes by M6P receptors [59]. After that, the enzyme is transported into the lysosome, where the breakdown of GAGs takes place [60]. However, ERT is not available for all MPS, and it is not curative. Although ERT can be very effective at treating the systemic disease, classical lysosomal enzymes are not capable of crossing the BBB or the BRB in the eye [56,61].

Nanoparticles coated with polysorbate 80 or poloxamer 188 that present apolipoproteins (Apo) A-1 and/or E adsorbed on the particle surface can traverse the BBB [15]. Apo can mediate the interaction of nanoparticles with LDL (low-density lipoprotein) receptors on brain capillary endothelial cells of the BBB followed by brain uptake [15,54]. The particles thus seem to mimic LDL and could interact with the lipoprotein receptors located on the brain capillary endothelial cells, followed by their endocytosis. The bound drug or protein may then be released from these cells into the cerebrospinal fluid (CSF), and then reach the brain. A study showed that Apo E-deficient mice had a reduced anti-nociceptive effect in comparison to normal mice after the injection of an analgesic bound to a nanoparticle. These results suggest that Apo E is involved in the transport of drugs bound to PBCA nanoparticles across the BBB [62]. The binding of Apo E, transferrin, insulin, or antibodies against its receptors also enables a similar drug transport across the BBB [63–67]. In a recent study, fusion

proteins comprised of lectin and human IDUA, were efficiently endocytosed into MPS I patient fibroblasts *in vitro*, and resulted in reduction of cellular GAG levels [68]. The lectin-mediated delivery was independent of M6P receptors, which are exploited for delivery of ERT. Thus, the lectin carrier may support distinct *in vivo* pharmacodynamics with potential to address hard-to-treat tissues.

Therefore, based on these findings, it should be possible to develop alternative means for delivering enzymes to the brain. Nanotechnology-based systems may be functionalized with receptor-binding molecules, thus promoting long-time circulation and controlled release [69]. They can also carry other molecules inside them, in the oil core, like genistein, which has been proven to reduce GAGs levels *in vitro* and in mouse models [70,71], providing two approaches in a single nanostructured carrier.

Using a somewhat similar approach, a clinical trial (NCT02371226) is ongoing for AGT-181 (ArmaGen, Calabasas, CA, USA), a fusion protein designed to cross the BBB in the same way that insulin does, making it unique among treatments for MPS I. ArmaGen developed AGT-181 by re-engineering alpha-L-iduronidase (IDUA) as an immunoglobulin G (IgG) fusion protein. The fusion protein binds to insulin receptors located on the surface of the BBB, enabling its passage and reaching the brain tissue [64–66,72].

In this context, nanotechnology-based systems that can deliver enzymes across the BBB could improve the therapeutic efficacy of ERT. A study evaluated the feasibility of producing nanoparticles for the treatment of MPS VI *in vitro* with arylsulfatase B (Naglazyme[®], BioMarin, Novato, CA, USA) adsorbed onto PBCA nanoparticles. Experiments demonstrated that the enzyme adsorption is stable for at least 60 minutes in human blood serum, indicating that the nanoparticle system is a promising alternative candidate for ERT for MPS VI [36]. Recently, a study demonstrated that biodegradable and biocompatible PLGA-nanoparticles modified with a 7-aminoacid glycopeptide (g7) were able to deliver a model drug (FITC-albumin) in MPS type I and II mice across the BBB. This result encourages experiments with enzyme-loaded g7-nanoparticles to the brain [73].

Nanoencapsulation could increase the ERT treatment responses in different ways, such as reducing its dosage, increasing its absorption, controlling its release,

and modifying the enzyme biodistribution in tissues [74]. In this context, a multiple-wall lipid core nanocapsule coated with chitosan and Fe^{2+} (ferrous ions) that allows the chemical binding of laronidase (Aldurazyme[®], Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) was recently described [25]. Lipid-core nanocapsules (LNC) acted as building blocks for the multiple-wall nanocapsules. LNC composition was PCL, Span[®] 60, capric and caprylic triglycerides, Lipoid[®] S75 (75% in phosphatidylcholine), polysorbate 80, chitosan, and Fe^{2+} solution. The nanoencapsulated enzyme was not cytotoxic and presented higher enzymatic activity, the same half-life, and an improved clearance profile compared with conventional laronidase. Moreover, higher enzyme activity was found in the liver, spleen, and heart of treated MPS I mice 4 hours after injection. After 24 hours, the nanoencapsulated enzyme treated animals maintained higher activity levels in both the liver and kidneys. Although the formulation was unable to reach the brain, a lower dose than that of conventional ERT achieved a higher activity in somatic tissues and could result in a reduction of the immunological responses to treatment.

The uniqueness of each MPS require different approaches of treatment. For example, MPS IV manifests mainly as bone disease [54]. Gene therapy and classical intravenous ERT are ineffective to reach the bone, unless the protein is modified for long-time circulation to have an affinity for this tissue [75]. A chemically modified beta-glucuronidase (GUSB) resistant to clearance from the bloodstream by M6P receptors, PerT-GUS, showed a prolonged half-life compared with the native enzyme in a MPS VII mouse model [76]. MPS VII mice treated with PerT-GUS showed improvements in bone lesions of the legs, ribs, and spine [77].

Another approach would combine ERT with a bone-targeting strategy. An enzyme attached to a hydroxyapatite-binding site, or alendronate (a drug with a high affinity for bone), could be released during the bone resorption process, and it may be a potential strategy for selective drug delivery to the bone [78,79]. These approaches combined with nanotechnology-based carriers could improve the clinical response, as they would allow a higher circulation time and thus better reach the bone tissues [78,80].

GENE THERAPY FOR MPS AND NANOTECHNOLOGY

In vivo gene therapy for MPS involves the injection of a vector that promotes the expression of the deficient enzyme, while *ex vivo* gene therapy consists of removing deficient cells from the patient, modifying them *in vitro*, and injecting them back into the patient. In both cases, gene therapy for MPS relies on the fact that the corrected cells can secrete the enzyme and cross-correct deficient cells [2]. Regarding the ideal timing for treatment, neonatal administration seems to be more efficient and cost-effective, but at the present time, diagnosis in the newborn period is an obstacle to be circumvented [81].

Gene therapy as a therapeutic strategy depends on a system that is able to both protect the genetic material and transport it effectively to its site of action. In this sense, scientists search for different vehicles as tools to allow the transfer of exogenous genetic material into cells. Fundamentally, it is possible to differentiate between two types of carriers: viral vectors (adenoviruses, adeno-associated viruses, lentiviruses, etc.) and non-viral or synthetic vectors (nanoemulsions, liposomes, nanoparticles, etc.).

Among the current pre-clinical studies and initial clinical trials involving gene therapy for MPS, most of them use adeno-associated viruses (AAV), with positive results [82–86]. While AAV-based systems remain the most popular gene delivery method due to their high efficiency and successful results, other delivery systems, such as non-viral nanoparticles and liposomes, are additional therapeutic options. The two approaches can even be combined [87].

Recent progresses in genome editing technology using engineered zinc finger nucleases (ZFN), transcriptional activator-like effector nucleases (TALEN), and the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) system have enabled the possibility of precisely modifying target sites in the genome without the use of viruses [88–90]. A recent study demonstrated that a transposable element (transposons) was able to integrate exogenous DNA into host cells, and showed benefits in MPS I mice [91,92]. Sangamo BioSciences Inc. (Richmond, CA, USA), is evaluating through a clinical trial (NCT02702115) the safety, the tolerability and the effect on plasma IDUA enzyme activity of ascending doses of SB-318. SB-318 is an

intravenously delivered ZFN therapeutic for genome editing. The Sangamo Inc. claim that their IVPRP[®] genome editing approach allows to precisely target and edit the albumin 'safe harbor' locus in the DNA of liver cells, with a single administration of an AAV, which is expected to result in the durable expression of the IDUA enzyme that would be maintained throughout the patient's life.

Successful gene therapy depends on the modification of a large number of cells (*in vivo* or *in vitro*), and this relies on the transfection efficiency. Optimized lipofection protocols for each cell type are also crucial. Studies involving non-viral approaches are less common, although they have become interesting mainly by virtue of their being safer, less immunogenic, mostly biocompatible and biodegradable, and showing good transfection efficiency *in vitro* and even *in vivo* [22,23,93]. The perfect nanotechnology-based system should be able to both protect the genetic material and deliver it to the target, ensuring patient safety.

The intravenous delivery of a DNA (deoxyribonucleic acid) plasmid to the brain across the BBB with the administration of a non-viral DNA plasmid encoding a lysosomal enzyme, beta-glucuronidase (GUSB), was examined in GUSB knockout (KO) mice, a model of MPS VII [94]. The plasmid, designated pCMV-GUSB, was adsorbed on Trojan horse liposomes composed of POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine), DDAB, DSPE-PEG2000, and DSPE-PEG2000-maleimide. The system was targeted across the BBB and the brain cell membrane through a monoclonal antibody to the mouse transferrin receptor [94]. The GUSB enzyme activity was increased more than 50-fold in a fibroblast cell culture obtained from GUSB KO mice following the application of the antibody-targeted liposomes carrying the pCMV-GUSB. The enzyme activity remained high for over 2 weeks. The treatment of adult GUSB KO mice consisted of a single intravenous injection of 0.2 ml of Trojan horse liposomes carrying the pCMV-GUSB at a dose of 10 mg of DNA plasmid. The GUSB enzyme activity increased tenfold in the brain, kidney, liver, lung, and spleen. This study showed the possibility of delivering a non-viral DNA plasmid encoding lysosomal enzymes to the brain following the intravenous administration of receptor-specific Trojan horse liposomes.

Recently, studies have demonstrated the feasibility of nanoemulsions for nucleic acid delivery. Cationic nanoemulsions, composed of an MCT oil core stabilized by

DOPE, DOTAP, and DSPE-PEG complexed with a pIDUA plasmid (containing the gene that encodes for alpha-L-iduronidase enzyme) with a charge ratio higher than +2/–, showed stability and nucleic acid protection against enzymatic degradation. The nanoemulsion complexed with pIDUA at +4/– charge ratio presented significant transfection efficiency *in vitro* in MPS I patient fibroblasts. The *in vivo* administration of complexes through the tail vein and portal vein or MPS I mice showed significantly higher IDUA activity in the lungs and liver. This set of results shows that the formulation obtained at the +4/– charge ratio is a promising non-viral gene delivery system, as it promotes increased enzyme activity both *in vitro* and *in vivo* [22]. Another study from the same group showed that the same formulations prepared by the adsorption or encapsulation of preformed pIDUA-DOTAP complexes into the oil core of nanoemulsions at different charge ratios protect the plasmid from DNase (deoxyribonuclease) I degradation. The intravenous injection of these formulations into MPS I mice led to a significant increase in IDUA activity and expression in different organs, especially the lungs and liver. These findings were more significant for formulations prepared at higher charge ratios (+4/–), suggesting a correlation between the charge ratio and transfection efficiency. Preclinical results demonstrated that the complexes could be a potential therapeutic option for the treatment of MPS I [23].

CONCLUSIONS

Recent advances in biomaterials and nanotechnology have enabled the production of new systems capable of carrying enzymes and genes involved in MPS diseases. This allowed the development of innovative strategies to correct enzyme deficiencies and genetic defects, especially in tissues of difficult access, such as the brain. It also enabled the possibility of new therapeutic protocols through controlled release using nanotechnology-based systems. Further investigation could provide alternative therapies for specific problems associated with MPS. However, making these treatments a reality for all types of MPS is still a challenge.

EXPERT OPINION

Although the molecular basis of gene and enzyme therapy has evolved, the primary limiting factor is still the lack of a system able to protect protein and genetic material while promoting widespread distribution and allowing its entry into the desired cell. In the early years, genetic diseases were the focus of gene therapy, but as they are rare disorders, trials are now aiming at common illnesses, such as cancer. According to the clinical trials platform of The Journal of Gene Medicine (wiley.co.uk/genmed/clinical2015), approximately 9% of clinical trials are performed on monogenic diseases, and less than 3% are for mucopolysaccharidoses. Of the total number of trials, approximately 5% are with lipofection. Naturally, the success of nonviral gene therapy is closely related to the molecular structure of the biomaterials used to prepare these systems, especially the nanotechnology-based ones. Current strategies focus on lipid or polymer systems, with a relatively restricted range of excipients used due to intrinsic toxicity or low efficacy. Some cationic polymers, such as chitosan, have been thoroughly tested, and even though they are suitable for transfection *in vitro*, they are yet unsuitable for human administration. A current trend seems to be the use of endogenous materials or having a percentage of a structure based on a naturally occurring material. The strategy of using purely synthetic materials, so far, has not produced the expected results. Regarding the nature of nanotechnology systems, there seems to have enough evidence to say that lipid systems are superior at this moment. Liposomes are the most common, with some formulations already approved for drugs, while nanoparticles have increasing citations in publications in the enzyme and gene therapy fields, but their use remains mostly in preclinical research, as their toxicity has not been fully elucidated for all routes of administration. Since the ideal system has not yet been found, the search for new systems for enzyme delivery and gene therapy must focus on the study of new biomaterials suitable for human use.

Regarding MPS treatment, reports of ERT available for MPS indicate that this treatment is successful but does not significantly correct bone disease, corneal opacity, heart valve problems, or neurological manifestations once the onset is present. Moreover, intravenous ERT does not cross the BBB and BRB, nor does it reach all difficult to access tissues. However, AGT-181 is a fusion enzyme that brings hope for

circumventing these issues. Thus, it is important to consider the development of alternative methods to approach the unmet needs of MPS therapy. The delivery of nanotechnology-based ERT with enzymes that are able to cross the BBB could provide a different approach to access the CNS (central nervous system) and even promote the controlled release of these enzymes with fewer side effects. Gene therapy likely represents the ultimate treatment for MPS diseases, but facing challenges is inevitable before it becomes a standard treatment, including vector choices. In addition, it seems that for multisystemic MPS diseases, a combination of a gene therapy protocol with ERT will be more likely to correct the overall disease symptoms. The development of nanocarriers capable of enzyme delivery to the brain, joints, eye, and other difficult sites is mandatory for MPS treatment. The choice of biomaterials is important, as they must be biocompatible, biodegradable, and bioabsorbable. Based on this, lipids are the leading choice among materials, as several polymers are not approved for human administration so far. There have been few studies involving nonviral carriers for the treatment of MPS diseases, which must be due to the low transfection efficiency and high cost of large-scale manufacture when compared to viral vectors. However, in our opinion, *in situ* vector injections could be another alternative for reaching difficult-to-correct sites, and viral vector injections combined with nanotechnology-based systems could be suitable for improved enzyme or gene delivery. In conclusion, persistent scientists are already researching to obtain the best delivery system that may provide the most appropriate treatment for every MPS patient.

REFERENCES

1. Giugliani R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. *Genet Mol Biol* 2012;35(4):924–31.
2. Baldo G, Giugliani R, Matte U. Gene delivery strategies for the treatment of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin Drug Deliv* 2014;11(3):449–59.
3. Giugliani R, Federhen A, Rojas MVM, et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet Mol Biol* 2010;33(4):589–604.
4. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, et al. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* 2008;29(24)–(5):3477–96.

5. Zorzi GK, Seijo B, Sanchez A. Endogenous Polymers as Biomaterials for Nanoparticulate Gene Therapy. In: Thakur VK, Thakur MK, eds. Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies. John Wiley & Sons, Inc., 2015. 237–59.
6. Fenske DB, Chonn A, Cullis PR. Liposomal nanomedicines: an emerging field. *Toxicol Pathol* 2008;36(1):21–9.
7. Bouchemal K, Briancon S, Perrier E, et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm* 2004;280(1)–(2):241–51.
8. Schuh RS, Bruxel F, Teixeira HF. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. *Quim Nova* 2014;37:1193–8.
9. Ravi Kumar M, Hellermann G, Lockey RF, et al. Nanoparticle-mediated gene delivery: state of the art. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4(8):1213–24.
10. Ditto AJ, Shah PN, Yun YH. Non-viral gene delivery using nanoparticles. *Expert Opin Drug Deliv* 2009;6(11):1149–60.
11. Kwon SM, Nam HY, Nam T, et al. In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier. *J Control Release* 2008;128(1):89–97.
12. Rao NM, Gopal V. Cationic lipids for gene delivery in vitro and in vivo. *Expert Opin Ther Pat* 2006;16(6):825–44.
13. Nordling-David MM, Golomb G. Gene Delivery by Liposomes. *Isr J Chem* 2013;53(9)–(10), (SI):737–47.
14. Lu C, Stewart DJ, Lee JJ, et al. Phase I clinical trial of systemically administered TUSC2(FUS1)-nanoparticles mediating functional gene transfer in humans. *PLoS One* 2012;7(4):e34833.
15. Lavigne MD, Górecki DC. Emerging vectors and targeting methods for nonviral gene therapy. *Expert Opin Emerg Drugs* 2006;11(3):541–57.
16. Bruxel F, Vilela JMC, Andrade MS, et al. Investigation of the structural organization of cationic nanoemulsion/antisense oligonucleotide complexes. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;112:530–6.
17. Zhou X, Huang L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1994;1189(2):195–203.
18. Nam HY, Park JH, Kim K, et al. Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers. *Arch Pharm Res* 2009;32(5):639–46.

19. McNeil SE, Perrie Y. Gene delivery using cationic liposomes. *Expert Opin Ther Pat* 2006;16(10):1371–82.
20. Verissimo LM, Lima LFA, Egito LCM, et al. Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy. *J Drug Target* 2010;18(5):333–42.
21. Liu C-H, Yu S-Y. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;79(2):509–15.
22. Fraga M, de Carvalho TG, Diel D da S, et al. Cationic Nanoemulsions as a Gene Delivery System: Proof of Concept in the Mucopolysaccharidosis I Murine Model. *J Nanosci Nanotechnol* 2015;15(1):810–6.
23. Fraga M, Bruxel F, Diel D, et al. PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model. *J Control Release* 2015;209:37–46.
24. Romøren K, Thu BJ, Bols NC, et al. Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2004;1663(1):127–34.
25. Mayer FQ, Adorne MD, Bender EA, et al. Laronidase-Functionalized Multiple-Wall Lipid-Core Nanocapsules: Promising Formulation for a More Effective Treatment of Mucopolysaccharidosis Type I. *Pharm Res* 2015;32:941–54.
26. Bruxel F, Laux M, Wild LB, et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Quim Nova* 2012;35:1827–40.
27. Gref R, Couvreur P. Nanocapsules: preparation, characterization and therapeutic applications. In: Torchilin VP, ed. *Nanoparticulates as drug carriers*. London: Imperial College Press, 2006. 720.
28. Kim SH, Jeong JH, Lee SH, et al. PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy. *J Control Release* 2006;116(2 SPEC. ISS.):123–9.
29. Bhattarai N, Ramay HR, Gunn J, et al. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. *J Control Release* 2005;103(3):609–24.
30. Fillion MC, Phillips NC. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1997;1329(2):345–56.
31. Kim TW, Chung H, Kwon IC, et al. Optimization of lipid composition in cationic emulsion as in vitro and in vivo transfection agents. *Pharm Res* 2001;18(1):54–60.
32. Vasir JK, Labhasetwar V. Polymeric nanoparticles for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2006;3(3):325–44.

33. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release* 2008;125:193–209.
34. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release* 2012;161(2):505–22.
35. Dziubla TD, Shuvaeva V V., Honga NK, et al. Endothelial targeting of semi-permeable polymer nanocarriers for enzyme therapies. *Biomaterials* 2008;29:215–27.
36. Muhlstein A, Gelperina S, Kreuter J. Development of nanoparticle-bound arylsulfatase B for enzyme replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI. *Pharmazie* 2013;68(7):549–54.
37. Wilson B. Brain targeting PBCA nanoparticles and the blood-brain barrier. *Nanomedicine (Lond)*. 2009;4(5):499–502.
38. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, et al. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm* 2004;278(1):1–23.
39. Dash TK, Konkimalla VB. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *J Control Release* 2012;158(1):15–33.
40. Gan Q, Wang T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2007;59(1):24–34.
41. Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm* 2004;274(1)–(2):1–33.
42. Matte U, Yogalingam G, Brooks D, et al. Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Mol Genet Metab* 2016;78(1):37–43.[http://dx.doi.org/10.1016/S1096-7192\(02\)00200-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-7192(02)00200-7)
43. Hollak CEM, Wijburg FA. Treatment of lysosomal storage disorders: successes and challenges. *J Inherit Metab Dis* 2014;37(4):587–98.
44. Giugliani R. Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. *J Inherit Metab Dis* 2012;35(5):871–7.
45. Wilkinson FL, Sergijenko A, Langford-Smith KJ, et al. Busulfan conditioning enhances engraftment of hematopoietic donor-derived cells in the brain compared with irradiation. *Mol Ther* 2013;21(4):868–76.
46. Lund TC. Hematopoietic stem cell transplant for lysosomal storage diseases. *Pediatr Endocrinol Rev* 2013;11 Suppl 1:91–8.

47. Aldenhoven M, Jones SA, Bonney D, et al. Hematopoietic cell transplantation for mucopolysaccharidosis patients is safe and effective: results after implementation of international guidelines. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(6):1106–9.
48. Patel P, Suzuki Y, Tanaka A, et al. Impact of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Therapy on Growth in Patients with Hunter Syndrome. *Mol Genet Metab reports* 2014;1:184–96.
49. Araya K, Sakai N, Mohri I, et al. Localized donor cells in brain of a Hunter disease patient after cord blood stem cell transplantation. *Mol Genet Metab* 2009;98(3):255–63.
50. Chinen Y, Higa T, Tomatsu S, et al. Long-term therapeutic efficacy of allogenic bone marrow transplantation in a patient with mucopolysaccharidosis IVA. *Mol Genet Metab reports* 2014;1:31–41.
51. Tanjuakio J, Suzuki Y, Patel P, et al. Activities of daily living in patients with Hunter syndrome: impact of enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Mol Genet Metab* 2015;114(2):161–9.
52. Yabe H, Tanaka A, Chinen Y, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for Morquio A syndrome. *Mol Genet Metab* 2016;117(2):84–94.
53. Gabrielli O, Clarke LA, Ficcadenti A, et al. 12 year follow up of enzyme-replacement therapy in two siblings with attenuated mucopolysaccharidosis I: the important role of early treatment. *BMC Med Genet* 2016;17(1):1–7.
54. Giugliani R, Federhen A, Vairo F, et al. Emerging drugs for the treatment of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin Emerg Drugs* 2016;21(1):9–26.
55. Valayannopoulos V, Wijburg FA. Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology* 2011;50(5):49–59.
56. Giugliani R, Federhen A, Silva A, et al. Emerging treatment options for the mucopolysaccharidoses. *Res Reports Endocr Disord* 2012;2:53–64.
57. Meikle PJ, Fuller M, Hopwood JJ. Lysosomal degradation of heparin and heparan sulfate. In: Garg HG, Linhardt RJ, Hales CA, eds. *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*. London: Elsevier Ltd., 2011. 792.
58. Hawkins-Salsbury JA, Reddy AS, Sands MS. Combination therapies for lysosomal storage disease: is the whole greater than the sum of its parts? *Hum Mol Genet* 2011;20(1):54–60.
59. Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, et al. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* 2001;344(3):182–8.
60. Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. Glycosaminoglycan degradation fragments in mucopolysaccharidosis I. *Glycobiology* 2004;14(5):443–50.

61. Ali J, Fazil M, Qumbar M, et al. Colloidal drug delivery system: amplify the ocular delivery. *Drug Deliv* 2016;23(3):710–26.
62. Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, et al. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target* 2002;10(4):317–25.
63. Michaelis K, Hoffmann MM, Dreis S, et al. Covalent linkage of apolipoprotein e to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317(3):1246–53.
64. Boado RJ, Zhou Q-H, Lu JZ, et al. Pharmacokinetics and Brain Uptake of a Genetically Engineered Bi-functional Fusion Antibody Targeting the Mouse Transferrin Receptor. *Mol Pharm* 2010;7(1):237–44.
65. Boado RJ, Zhang Y, Zhang Y, et al. Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood-brain barrier. *Biotechnol Bioeng* 2007;96(2):381–91.
66. Boado RJ, Hui EK-W, Lu JZ, et al. AGT-181: Expression in CHO Cells and Pharmacokinetics, Safety, and Plasma Iduronidase Enzyme Activity in Rhesus Monkeys. *J Biotechnol* 2009;144(2):135–41.
67. Osborn MJ, McElmurry RT, Peacock B, et al. Targeting of the CNS in MPS-IH using a nonviral transferrin-alpha-L-iduronidase fusion gene product. *Mol Ther* 2008;16(8):1459–66.
68. Acosta W, Ayala J, Dolan MC, et al. RTB Lectin: a novel receptor-independent delivery system for lysosomal enzyme replacement therapies. *Sci Rep* 2015;5:141–4.
69. Chen Z-L, Huang M, Wang X-R, et al. Transferrin-modified liposome promotes alpha-mangostin to penetrate the blood-brain barrier. *Nanomedicine* 2016;12(2):421–30.
70. Malinowska M, Wilkinson FL, Bennett W, et al. Genistein reduces lysosomal storage in peripheral tissues of mucopolysaccharide IIIB mice. *Mol Genet Metab* 2009;98(3):235–42.
71. Friso A, Tomanin R, Salvalaio M, et al. Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. *Br J Pharmacol* 2010;159(5):1082–91.
72. Boado RJ, Hui EK-W, Lu JZ, et al. Reversal of lysosomal storage in brain of adult MPS-I mice with intravenous Trojan horse-iduronidase fusion protein. *Mol Pharm* 2011;8(4):1342–50.
73. Salvalaio M, Rigon L, Belletti D, et al. Targeted Polymeric Nanoparticles for Brain Delivery of High Molecular Weight Molecules in Lysosomal Storage Disorders. *PLoS One* 2016;11(5):e0156452.

74. Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM. Nanotechnological applications in medicine. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18(1):26–30.
75. Tomatsu S, Alméciga-Díaz CJ, Montaña AM, et al. Therapies for the bone in mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab* 2015;114(2):94–109.
76. Grubb JH, Vogler C, Levy B, et al. Chemically modified beta-glucuronidase crosses blood-brain barrier and clears neuronal storage in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(7):2616–21.
77. Rowan DJ, Tomatsu S, Grubb JH, et al. Long circulating enzyme replacement therapy rescues bone pathology in mucopolysaccharidosis VII murine model. *Mol Genet Metab* 2012;107(1)–(2):161–172.
78. Wang G, Mostafa NZ, Incani V, et al. Bisphosphonate-decorated lipid nanoparticles designed as drug carriers for bone diseases. *J Biomed Mater Res A* 2012;100(3):684–93.
79. Kasugai S, Fujisawa R, Waki Y, et al. Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)₆ conjugation. *J Bone Miner Res* 2000;15(5):936–43.
80. Xinluan W, Yuxiao L, Helena NH, et al. Systemic drug delivery systems for bone tissue regeneration- a mini review. *Curr Pharm Des* 2015;21(12):1575–83.
81. Baldo G, Mayer FQ, Martinelli BZ, et al. Enzyme replacement therapy started at birth improves outcome in difficult-to-treat organs in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab* 2016;109(1):33–40.
82. Gurda BL, De Guilhem De Lataillade A, Bell P, et al. Evaluation of AAV-mediated Gene Therapy for Central Nervous System Disease in Canine Mucopolysaccharidosis VII. *Mol Ther* 2016;24(2):206–16.
83. Ruzo A, Marco S, Garcia M, et al. Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer. *Hum Gene Ther* 2012;23(12):1237–46.
84. Hinderer C, Bell P, Gurda BL, et al. Intrathecal gene therapy corrects CNS pathology in a feline model of mucopolysaccharidosis I. *Mol Ther* 2014;22(12):2018–27.
85. Sorrentino NC, D’Orsi L, Sambri I, et al. A highly secreted sulphamidase engineered to cross the blood-brain barrier corrects brain lesions of mice with mucopolysaccharidoses type IIIA. *EMBO Mol Med* 2013;5(5):675–90.
86. Vance M, Llanga T, Bennett W, et al. AAV Gene Therapy for MPS1-associated Corneal Blindness. *Sci Rep* 2016;6:22131.
87. Fein DE, Limberis MP, Maloney SF, et al. Cationic Lipid Formulations Alter the In Vivo Tropism of AAV2/9 Vector in Lung. *Mol Ther* 2009;17(12):2078–87.

88. Carvalho TG, Silveira Matte U, Giugliani R, et al. Genome Editing: Potential Treatment for Lysosomal Storage Diseases. *Curr Stem Cell Reports* 2015;1(1):9–15.
89. Tan WS, Carlson DF, Walton MW, et al. Precision editing of large animal genomes. *Adv Genet* 2012;80:37–97.
90. Esvelt KM, Wang HH. Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol Syst Biol* 2013;9:641.
91. Aronovich EL, Bell JB, Khan SA, et al. Systemic correction of storage disease in MPS I NOD/SCID mice using the sleeping beauty transposon system. *Mol Ther* 2009;17(7):1136–44.
92. Aronovich EL, Hall BC, Bell JB, et al. Quantitative analysis of alpha-L-iduronidase expression in immunocompetent mice treated with the Sleeping Beauty transposon system. *PLoS One* 2013;8(10):e78161.
93. Fraga M, Bruxel F, Lagranha VL, et al. Influence of phospholipid composition on cationic emulsions/DNA complexes: physicochemical properties, cytotoxicity, and transfection on Hep G2 cells. *Int J Nanomedicine* 2011;6:2213–20.
94. Zhang Y, Wang Y, Boado RJ, et al. Lysosomal enzyme replacement of the brain with intravenous non-viral gene transfer. *Pharm Res* 2008;25(2):400–6.

2.1. INTRODUÇÃO

Neste segundo capítulo, é demonstrada a utilização de nanoemulsões co-complexadas com o plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e com o oligonucleotídeo doador da sequência correta do gene IDUA para edição gênica de fibroblastos de pacientes MPS I. As nanoemulsões (DOPE, DOTAP, DSPE-PEG e TCM) foram preparadas através de homogeneização à alta pressão e a complexação com os ácidos nucleicos foi realizada através da adsorção ou encapsulamento dos complexos pré-formados de DNA/DOTAP no núcleo oleoso das formulações. Os resultados globais demonstraram a estabilidade de associação das formulações com o DNA, pois somente após 24 horas de incubação foram observadas bandas de DNA liberado no gel de agarose submetido à eletroforese, exceto para a formulação encapsulada que permaneceu complexada mesmo após 48 horas de incubação. Após 24 horas de incubação em meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino todos os complexos possuíam bandas de DNA levemente degradado. A administração dos complexos in vitro em fibroblastos de pacientes MPS I com a mutação Trp402 conduziu a um aumento significativo na atividade enzimática de IDUA em dois, quinze e trinta dias após os tratamentos. A morfologia celular foi verificada por microscopia confocal através da marcação dos lisossomos com o fluoróforo LysoDeep, e observou-se fenótipo semelhante ao dos fibroblastos normais, como constatado pela quantificação do fluoróforo por citometria de fluxo. Esses resultados demonstraram que esses complexos lipídicos são eficientes vetores não-virais para o sistema CRISPR/Cas9 e possibilitam a transfecção e a correção da mutação Trp402* e a produção de IDUA pelos fibroblastos de pacientes MPS I, e representam uma opção em potencial para o tratamento da MPS I.*

2.2. ARTIGO CIENTÍFICO

Gene editing of MPS I human fibroblasts by co-delivery of a CRISPR/Cas9 plasmid
and a donor oligonucleotide using nanoemulsions as nonviral carriers

Publicado no European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2017

GENE EDITING OF MPS I HUMAN FIBROBLASTS BY CO-DELIVERY OF A CRISPR/CAS9 PLASMID AND A DONOR OLIGONUCLEOTIDE USING NANOEMULSIONS AS NONVIRAL CARRIERS

Roselena Silvestri Schuh^{1,3}, Talita Giacomet de Carvalho^{2,3}, Roberto Giugliani^{2,3}, Ursula Matte^{2,3}, Guilherme Baldo^{2,3}, Helder Ferreira Teixeira^{1,#}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Centro de Terapia Gênica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, R. Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Helder F. Teixeira

E-mail: helder@farmacia.ufrgs.br

Telephone: +55 51 33085231

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an inherited disease caused by the deficiency of alpha-L-iduronidase (IDUA). This study shows the use of nanoemulsions co-complexed with the plasmid of CRISPR/Cas9 system and a donor oligonucleotide aiming at MPS I gene editing *in vitro*. Nanoemulsions composed of MCT, DOPE, DOTAP, DSPE-PEG, and water were prepared by high-pressure homogenization. The DNA was complexed by adsorption or encapsulation of preformed DNA/DOTAP complexes with nanoemulsions at +4/ -1 charge ratio. The overall results showed that the lipid nanostructures can strongly bind the DNA, which enables the protection against DNase I enzymatic degradation. The incubation in DMEM or with serum showed that the complexation with DNA was stable after 1 h of incubation, but the complexes tended to release the adsorbed DNA after 24 h of incubation, while the encapsulated DNA remained complexed in the oil core of the nanoemulsions even 48 h after incubation with DMEM. The treatment of MPS I patient's fibroblasts homozygous for the p.Trp402* mutation led to a significant increase in IDUA activity at 2, 15, and 30 days when compared to MPS I untreated fibroblasts. Flow cytometry and confocal microscopy demonstrated that there was a reduction in the area of lysosomes to values similar to normal, an indicator of correction of the cellular phenotype. These results show that the nanoemulsions co-complexed with the CRISPR/Cas9 system and a donor oligonucleotide could effectively transfect MPS I p.Trp402* patient's fibroblasts, as well as enable the production of IDUA, and represent a potential new treatment option for MPS I.

Keywords: CRISPR/Cas9; Gene therapy; Gene editing; Mucopolysaccharidosis type I; Nanoemulsion; Nonviral vectors.

INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I, OMIM #607014 #607015 #607016) is a lysosomal storage disorder caused by the accumulation of the glycosaminoglycans (GAGs) heparan and dermatan sulphate, due to the deficiency of the enzyme alpha-L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76). The disease is characterized by multiple tissue and organ dysfunctions that include organomegaly, stiff joints, skeletal and heart abnormalities, and neurocognitive impairment, among several other signs and symptoms [1]. *IDUA* mutation frequencies vary worldwide, but c.1205G>A (p.Trp402*) is the most frequent mutation found in European and South American patients [2]. The p.Trp402* mutation is a single base substitution (TGG to TAG) that introduces a stop codon at position 402 of the IDUA protein and is associated with an extremely severe clinical phenotype in homozygous patients, producing undetectable levels of IDUA [1].

The treatments currently available for MPS I are enzyme replacement therapy (ERT) and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Both treatments improve several symptoms in MPS I patients, but some tissues, such as bone, eye, heart valves, and brain, have limited or no improvements after therapy. Besides, ERT does not cross the blood–brain barrier (BBB), while HSCT is only effective if performed early in life, before cognitive decline [3–5]. Researchers have tried novel therapies to circumvent these problems such as gene therapy [6].

Among gene therapy approaches, the CRISPR/Cas technology has been recently studied for genome editing in mammals [7–9]. The CRISPR/Cas9 system requires the RNA-guided DNA endonuclease Cas9 protein that breaks DNA and a variable CRISPR RNA (crRNA) and a trans-activating crRNA (tracrRNA) duplex, which can be combined into a single guide RNA (gRNA) that promotes DNA target recognition [10]. There are only two requirements for Cas9 to cleave a substrate: base pairing between the 5' end of the gRNA and the target DNA, and the presence of an NGG motif (the PAM) immediately downstream of the target sequence. Thus, by changing the targeting sequence at the 5' end of the gRNA, Cas9 can be programmed to target a wide variety of sequences [8,11]. The CRISPR/Cas9 system can be delivered to cells either naked or carried by viral or nonviral vectors, and along with the system plasmid, a donor of the correct DNA sequence must be co-delivered when the main desired result is repairing a mutation in the genome [12].

Nanotechnology-based gene therapy is an interesting option for MPS I patients, given that nonviral vectors are biocompatible, biodegradable, bioabsorbable, low cost, and have low immunogenicity [12–15]. Cationic lipid-based carriers represent the most intensively studied and employed nonviral vectors. Among these are nanoemulsions, comprised by an oil core stabilized by an emulsifying layer of cationic lipids that associate with the phosphate groups of nucleic acids through electrostatic interactions. Some evidence have shown an improved transfection efficiency of nanoemulsions as nonviral carriers, and some studies have even demonstrated satisfactory results in MPS I models [14,16–20]. However, there is a lack of studies demonstrating the efficiency of nanoemulsions as vectors for the co-delivery of a plasmid and an oligonucleotide, which is essential for the CRISPR/Cas9 technology.

Our previous work used a traditional plasmid vector overexpressing IDUA cDNA. However, although studies showed a significant increase in IDUA activity, it was transient [22,23]. To achieve long-term correction of a genetic disease, we decided to test gene editing via CRISPR/Cas system.

Therefore, this study aimed to investigate the physicochemical characteristics of cationic nanoemulsions co-complexed with a CRISPR/Cas9 plasmid and a donor oligonucleotide aiming at the correction of the p.Trp402* mutation in the *IDUA* gene by assessing the transfection efficiency of these complexes in MPS I human fibroblasts.

MATERIALS AND METHODS

Vectors

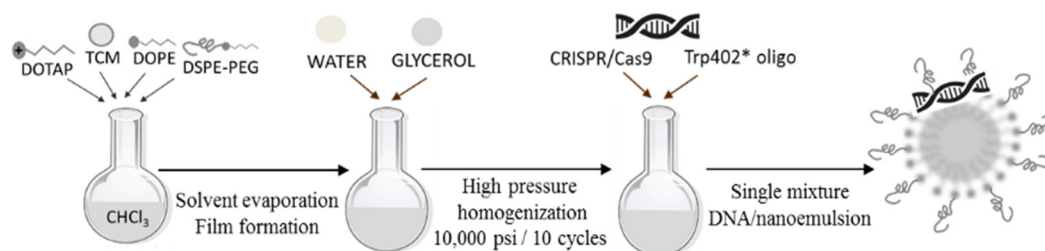
The PrecisionXTM® CRISPR/Cas9 SmartNuclease system (System Biosciences, Palo Alto/CA, USA) was used for genome editing experiments. In this system, the Cas9 nuclease and the guide RNA formed by a crRNA-tracrRNA transcript are present in a single vector. A 20 bp target sequence adjacent to a NGG (PAM sequence) which is 16 nucleotides distant from the mutated base on p.Trp402* was selected with the aid of an online software (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu>) (Figure 2.1A). The choice of the gRNA was particularly based in the sequence that had the lower number of off-target sites. Sense and antisense oligonucleotides were synthesized, annealed and ligated to the vector that encodes the Cas9. The plasmid

Preparation of formulations

Nanoemulsions were prepared by high-pressure homogenization and complexes comprise the association with DNA at +4/ -1 charge ratio.

A schematic representation of the preparation of DNA/nanoemulsion complexes by adsorption or encapsulation of preformed hydrophobic DNA/DOTAP complex was depicted in Figure 2.2.

Nanoemulsion - Adsorption



Nanoemulsion - Encapsulation

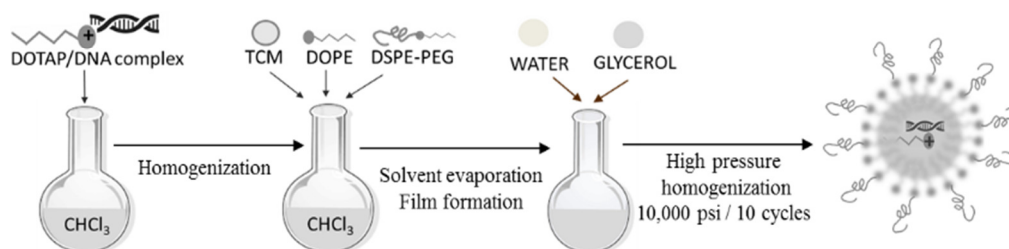


Figure 2.2. Schematic representation of the preparation of DNA/nanoemulsion complexes by adsorption or encapsulation of preformed hydrophobic DNA/DOTAP complex.

Preparation of blank formulations

Blank nanoemulsions (N) were composed of 5.0 % (w/ w) medium chain triglycerides (MCT) (Lipoid, Ludwigshafen, GER), 0.56 % (w/ w) phospholipid 1,2-di-(9E-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) (Lipoid, Ludwigshafen, GER), 0.56 % (w/ w) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane (DOTAP) (Lipoid, Ludwigshafen, GER), 0.285 % (w/ w) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium

salt) (DSPE-PEG) (Lipoid, Ludwigshafen, GER), 2.25 % (w/ w) glycerol (Merck, Rio de Janeiro, BRA), and bi distilled water up to 100 %. Lipids were dissolved in chloroform and evaporated under reduced pressure (40 °C). The lipid film was hydrated in an aqueous glycerol solution, vortexed for 1 min and left to stand overnight at 4 °C. On the following day, formulations were sonicated (Unique, São Paulo, BRA) for 15 min at 38 °C. Finally, emulsions were passed through a high-pressure homogenizer (Avestin, Ottawa, CAN) at 10,000 psi for 10 cycles.

Preparation of the hydrophobic DNA/DOTAP complex

The hydrophobic DNA/DOTAP complex was prepared as described by Fraga et al. [20] with some modifications. DNA was first incubated with DOTAP in a monophasic mixture of chloroform: methanol: water (1:2.1:1) at room temperature and left to stand for 30 min. The monophasic mixture was then partitioned into a two-phase system by the addition of chloroform and water (2 mL each), followed by brief vortexing. The upper aqueous and lower organic phases were separated by centrifugation at 2000 ×g for 10 min at room temperature. The aqueous and organic phases were collected separately and their fluorescence was determined using a Qubit® 2.0 Fluorimeter (Life Technologies, Carlsbad/CA, USA), with the aim of quantifying whether DNA remained in the aqueous or organic phase. Fluorescence in the interface was calculated by subtracting the fluorescence of aqueous and organic phases from the total fluorescence.

Preparation of DNA/nanostructure complexes

Complexes were prepared by the adsorption of DNA onto blank nanoemulsions or by the incorporation of preformed DNA/DOTAP complex into the oil core of nanoemulsions. The ratio of CRISPR/Cas9 plasmid and donor oligonucleotide was 1:1 (w/w). DNA adsorption was performed by the addition of previously established amounts of DNA to blank nanoemulsions at room temperature, resulting in NA (nanoemulsion/adsorbed DNA) complexes. DNA encapsulation was performed by addition of the preformed DNA/DOTAP complex (obtained as described in the previous section) into the lipid mixture during nanoemulsion preparation. Those complexes were labelled NE (nanoemulsion/encapsulated DNA).

The two complexes were prepared at the theoretical +4/ -1 charge ratio (ratios of the positive charges from cationic lipids to the negative charges from DNA phosphate groups and DSPE-PEG), since the complexes at this charge ratio has been proven to be more stable according to previous studies [17,20].

Droplet size and zeta potential

The mean droplet size, polydispersity index (P.I.), and ζ -potential of the formulations and complexes were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) at 90° and electrophoretic mobility measurements (3000HS Zetasizer, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The samples were diluted in water or 1 mM NaCl.

Agarose gel electrophoresis

The complexation of the CRISPR/Cas9 plasmid and p.Trp402* donor oligonucleotide with the cationic formulations was verified by agarose gel electrophoresis. The extent of DNA decomplexation was assessed in a similar way. The complexes were incubated in serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, LGC Biotecnologia, São Paulo, BRA) or DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, São Paulo, BRA) for 1, 24, and 48 h. Then, complexes were electrophoresed in 1 % agarose gel stained with SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad/CA, USA). Naked DNA was used as control.

***In vitro* experiments**

Cells used in the experiments are from primary fibroblast culture obtained from human skin biopsy. The cells were obtained from young MPS I patients with Hurler syndrome (genotype p.Trp402*/p.Trp402*) and normal subjects under informed consent. The project was approved by the local ethics committee (CEUA /HCPA#150416).

Fibroblasts were cultivated in DMEM supplemented with 10 % FBS and 1 % ampicillin / streptomycin. The cells were grown to 70 % – 80 % confluence, and incubated in a humidified CO₂ incubator at 37 °C.

Cell viability assay

Cell viability was assessed in MPS I fibroblasts using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, USB Corporation, Cleveland/OH, USA) assay, performed after incubation with blank nanoemulsions, and NA and NE complexes. Cells were cultivated in DMEM containing 10 % FBS (Gibco, Grand Island/NY, USA), and 1 % ampicillin / streptomycin, and seeded at 1×10^4 cells/ well in a 96-well plate. Increasing volumes of the blank formulations and complexes (0, 2.82, 5.64, 11.35, 22.6, 45, and 90 μL) were incubated with the fibroblasts cultivated in DMEM for 48 h, then the medium was removed, and a 5 g/L MTT solution was added. Cells were incubated at 37 °C with 5 % CO₂ for 4 h. After that, 100 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO, Synth Solutions, São Paulo, BRA) were added to dissolve the blue formazan crystals. The optical density was measured at 570 nm using a spectrophotometer (Anthos, Hamburg, GER). Cells incubated in DMEM were used as control for 100 % cellular viability, while 0 % of cellular viability was obtained after incubation of cells with Triton X-100 (2 %, w/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis/MO, USA).

Gene transfer

MPS I fibroblasts at passages 2 - 6 were seeded at 5×10^4 cells/well in a 6-well plate, cultivated in DMEM containing 10 % FBS, and 1 % ampicillin / streptomycin and maintained in a humidified CO₂ incubator at 37 °C for 24 h before the assay. The cells were grown to 50 % – 60 % confluence and gene transfer was performed by incubating the cells with 60 μL of complexes containing 10 μg of each DNA sequence, Naked oligo, Naked CRISPR, Naked Oligo/CRISPR, or Lipofectamine 3000™ (according to manufacturer's instructions) for 24 h in serum-free DMEM, then 10 % FBS was added and cells were incubated up to 48 h.

IDUA activity

At 2 days, 15 d or 30 d after transfection, the culture medium was collected and the fibroblasts were suspended in trypsin, centrifuged, and resuspended in bi distilled water. After vortex, cells were centrifuged and the supernatant as well as the culture medium were used to assess IDUA activity using the 4-methylumbelliferyl alpha-L-iduronide (Glycosynth, Warrington, UK) as substrate. Both samples were incubated at 37 °C for 1 h in sodium formate buffer (pH 2.8), according to Baldo et al [21]. Fluorescence was measured with 365 nm excitation and 450 nm emission filters in a fluorescence spectrophotometer (SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale/CA, USA). Results for culture medium are presented as nmol/h/mL and results in fibroblasts were calculated in nmol/h/mg protein and shown as a percentage of IDUA activity from a normal fibroblast. The protein content was quantified using the method described by Lowry and coworkers [22].

CytoPainter LysoDeep® Red Indicator labeling

The cultivated cells were transferred to cover-slips inside a culture plate filled with DMEM supplemented with 10 % FBS. At 2 d and 30 d after treatment, treated fibroblasts, MPS I untreated fibroblasts, and normal fibroblasts were labeled with the fluorogenic probe CytoPainter LysoDeep® Red Indicator Reagent (ab176829, Abcam, Cambridge, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated with dye for 30 minutes at 37 °C and then washed in Hank's Balanced Salt Solution with 20 mM Hepes buffer (HHBS). Half of the cells were analyzed for fluorescence intensity by flow cytometry and other half was fixed in 4 % paraformaldehyde, and analyzed under a Leica TCS SP8 MP confocal laser microscope (Leica Microsystems, Buffalo Grove/IL, USA).

Confocal microscopy

After 30 min of incubation at 37 °C with CytoPainter LysoDeep® Red Indicator, cells were fixed in 4 % paraformaldehyde for 15 min, and mounted with Fluoroshield® mounting medium with DAPI (Abcam, Cambridge, UK). Images were acquired in fluorescence (Ex/Em = 596/619 nm) and transmission channels with a 63x glycerin-

immersion objective in a Leica TCS SP8 MP confocal laser microscope (Leica Microsystems, Buffalo Grove/IL, USA). Images were analyzed by ImageJ software (n=10).

Flow cytometry

After incubation with the CytoPainter LysoDeep® Red Indicator, live cells were resuspended in HHBS buffer and analyzed for fluorescence intensity levels by Invitrogen® Attune® NXT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA). First, an FSC/SSC gate was delineated to define a live gate analysis (designated as the right pink area R5 in Supplementary figure 2). Fluorescence intensity from samples was then compared by histogram analysis. The first comparison was among MPS I and normal fibroblasts (n=5). Then the two treated groups were compared to MPS I untreated group at different times of culture (2 d, 15 d, and 30 d). For each sample, 10,000 events were acquired.

Data analysis

Films obtained in agarose gel electrophoresis and pictures obtained in microscopy were scanned to capture their images. Optical density (OD) of each gel and picture was measured using the NIH ImageJ 1.44b software. Results were expressed as the mean \pm standard deviation of at least three independent experiments.

For statistical analysis, the GraphPad Prism software was used. Student's *t* test was used to compare mean droplet size, zeta potential, and Normal and MPS I groups from flow cytometry assay. One-way ANOVA with Tukey as post-hoc were used to compare MPS I and treated groups in flow cytometry results. For IDUA activity and confocal microscopy, Kruskal-Wallis test with Dunns as post hoc were used, and results were expressed as the mean \pm standard error of the mean of ten independent experiments. Statistical differences among groups were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

Physicochemical properties of the formulations

The physicochemical properties of N, NA, and NE formulations and complexes were summarized in Table 2.1. Mean droplet size of the nanoemulsions N, NA, and NE ranged from 175 to 214 nm. Droplet size tended to increase with the addition of DNA to the blank formulations, but there was no significant difference between NA and NE. Blank formulation N showed a positive zeta potential of approximately +40 mV, which significantly decreased when DNA was added to the formulation (NA and NE) (Student's t-test, $p < 0.05$).

The polydispersity index was significantly lower for the complexes (NA and NE) when compared with the blank formulation (N).

Table 2.1. Physicochemical properties of N, NA, and NE formulations at +4/ -1 charge ratios: droplet size, polydispersity index (P.I.), and Zeta potential.

Formulation	Droplet size (nm)	P.I.	Zeta potential (mV)
N	175.8 ± 1.6	0.24 ± 0.01	+40.6 ± 1.2
NA	212.5 ± 1.0 ^a	0.12 ± 0.04	+30.2 ± 1.2 ^b
NE	214.3 ± 2.6 ^a	0.14 ± 0.03	+28.5 ± 1.1 ^b

Results represent the mean ± standard deviation of three experiments; difference before and after complexation. Student's t-test, $p < 0.05$. ^a Mean diameter. ^b Zeta potential. N = blank nanoemulsion, NA = nanoemulsion/adsorbed DNA, and NE = nanoemulsion/encapsulated DNA.

DNA decomplexation assay

The nucleic acids complexation with nanoemulsions was evaluated by agarose gel electrophoresis. Nucleic acids were retained at the application site of agarose gel for both NA and NE, indicating the complexes formation. Nucleic acids decomplexation was evaluated after incubation in serum-free DMEM or DMEM/ 10 % FBS and 1 % ampicillin/ streptomycin (Figure 2.3).

It is possible to observe that the nucleic acids were not released from NA or NE (Figure 2.3A) complexes after 1 h of incubation in both DMEM with or without FBS supplementation. However, after 24 h of incubation in DMEM, one can notice that

CRISPR/Cas9 plasmid was slightly released from NA complexes, but not the oligonucleotide (Figure 2.3A), while encapsulated DNA was not released from the NE complexes. After 24 h of incubation in DMEM supplemented with 10 % FBS and 1 % ampicillin / streptomycin, the DNA was released from NA complexes and presented slight degradation (Figure 2.3A), while the DNA remained encapsulated in NE complexes. After 48 h of incubation in DMEM, NA (Figure 2.3A) showed both plasmid and oligonucleotide slight decomplexation, however, NE complex still did not present DNA release (Figure 2.3A). After 48 h of incubation in supplemented DMEM, the two complexes NA and NE presented fragments of slightly degraded DNA.

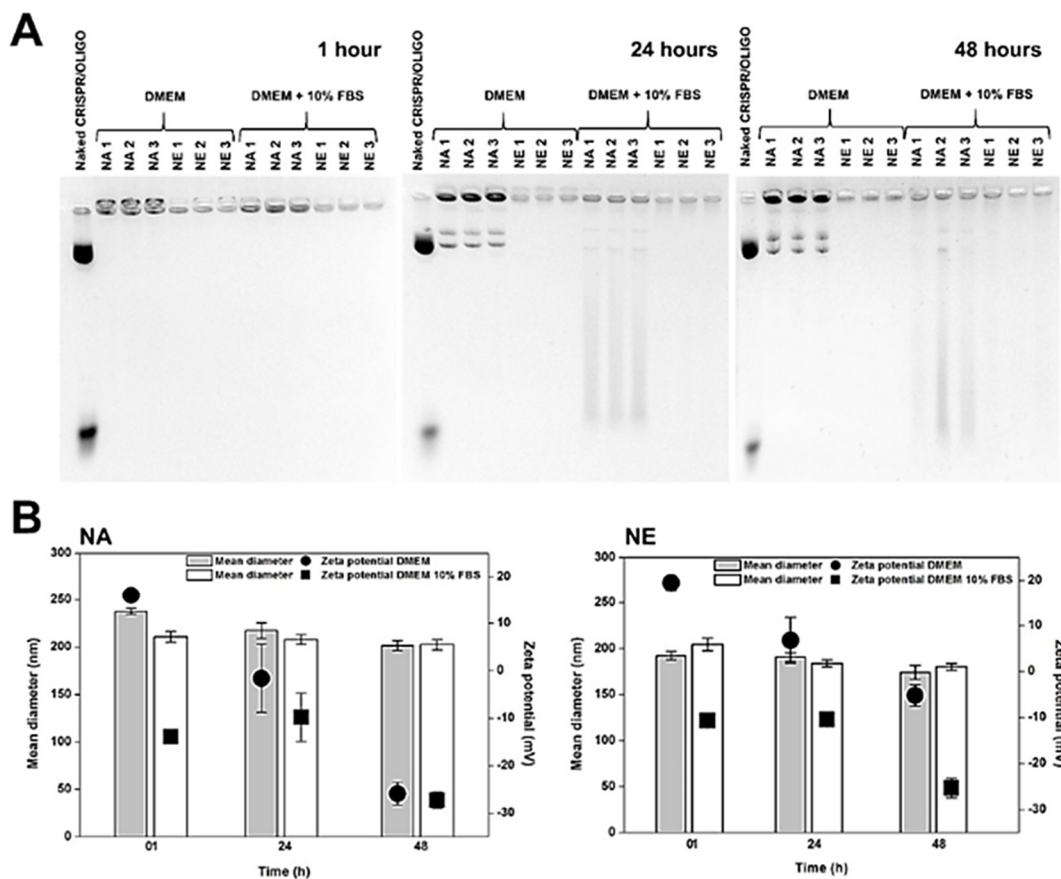


Figure 2.3. (A) CRISPR-Cas9 plasmid and p.Trp402* donor oligonucleotide decomplexation from NA and NE after incubation in DMEM or DMEM + 10 % FBS. DNA migration after 1 h, 24 h, and after 48 h of incubation. **(B)** Mean diameter (bars) and ζ -potential (circles or squares) of NA and NE after incubation in DMEM (grey bars and circles) or DMEM supplemented with 10 % FBS (white bars and squares). Results represent the mean \pm standard deviation of three experiments. Naked CRISPR/OLIGO = free DNA; NA = nanoemulsion/ adsorbed DNA; NE = nanoemulsion/ encapsulated DNA.

The physicochemical properties of the complexes were analyzed at the same conditions under which the decomplexation of the CRISPR/Cas9 plasmid and p.Trp402* donor oligonucleotide were assessed (Figure 2.3B). The overall results showed no significant change in the droplet size of NA and NE (Figure 2.3B) complexes, whose droplet sizes remained at approximately 200 - 250 nm after incubation with DMEM supplemented or not with 10% FBS. Conversely, the zeta potential of the complexes decreased to negative values over time. This reduction occurred faster and to lower values when the complexes were incubated in DMEM/10 % FBS. Thus, serum-free DMEM was chosen for the first 24 h incubation of treatments, and then FBS was added to the cells.

***In vitro* experiments**

IDUA activity

The transfection efficiency was assessed in MPS I patient's fibroblasts treated with NA (Figure 2.4, squares) or NE (Figure 2.4, circles) complexes at 2 d, 15 d, and 30 d after transfection.

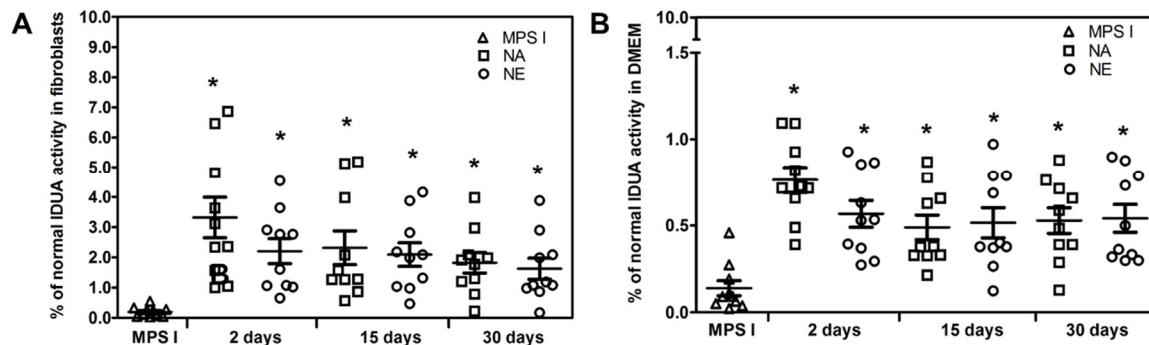


Figure 2.4. Transfection efficiency: percentage of normal IDUA activity achieved after incubation with complexes. **(A)** Percentage of normal IDUA activity in cell lysate. Untreated MPS I fibroblasts (triangles), MPS I fibroblasts treated with NA (squares) or NE (circles). **(B)** Percentage of normal IDUA activity measured in DMEM culture medium over time. Untreated MPS I fibroblasts (triangles), MPS I fibroblasts treated with NA (squares) or NE (circles). Results represent the mean \pm standard error of the mean of ten experiments; * $p < 0.05$, compared to untreated MPS I fibroblasts at the same time of culture (Kruskal-Wallis test followed by Dunns post-hoc). NA = nanoemulsion/ adsorbed DNA; NE = nanoemulsion/ encapsulated DNA; normal IDUA activity in fibroblasts = 74 – 120 nmol/ h/ mg protein; normal IDUA activity in DMEM = 40 – 60 nmol/ h/ mL DMEM.

Untreated MPS I fibroblasts were used as negative control and transfection efficiency was presented as a percentage of IDUA activity in normal fibroblasts (nmol/h/mg protein) or in DMEM (nmol/h/mL DMEM). Other controls were used, as Naked Oligo, Naked CRISPR, and Naked Oligo/CRISPR, although there was no significant difference between MPS I results (Supplementary figures 2.2A and 2.2C).

When NA or NE complexes were added to the cell cultures, a significant increase in IDUA activity was observed after treatment (Figure 2.4A). However, there was no statistical difference between the two treatments at the same time of culture. Some single treatments achieved activities higher than 6 %, although the average results were around 2 - 4 % of normal IDUA activity. The measurements in DMEM culture medium were also significant for both formulations at all times of culture (Figure 2.4B). Both treatments were similar to Lipofectamine 3000™ transfection reagent (Supplementary figures 2.2B and 2.2D).

Confocal microscopy

The fibroblasts were stained with LysoDeep® and FluoroShield® with DAPI stains and the images were analyzed under a confocal microscope (Figure 2.5).

The red dots are the lysosomes colored with LysoDeep®, and the blue areas are the nucleic acids in the cell's nucleus stained with DAPI (Figure 2.5A). Untreated MPS I fibroblasts and normal fibroblasts were used as controls.

After treatment with NA or NE a decrease in the red stained area could be progressively observed, and the lysosomes seemed smaller in comparison with MPS I fibroblasts. The analysis by ImageJ (Figure 2.5B) confirmed statistical difference at 30 d after treatments, with a 22% reduction of fluorescence in the cells treated with NA, and 20% with NE, similar to normal cells.

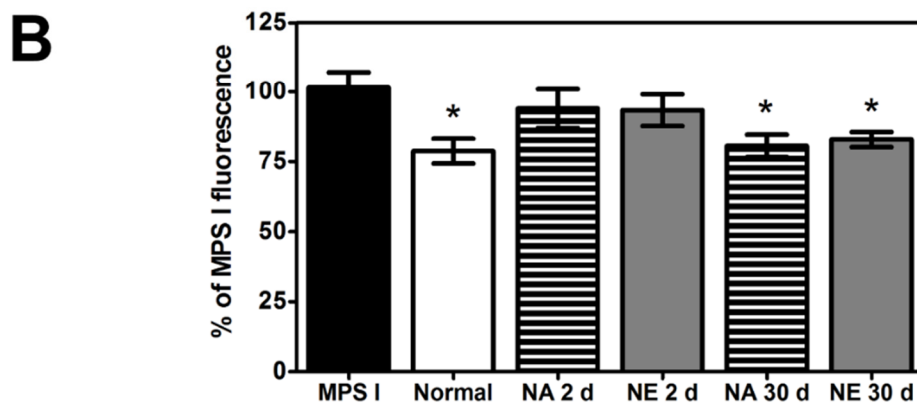
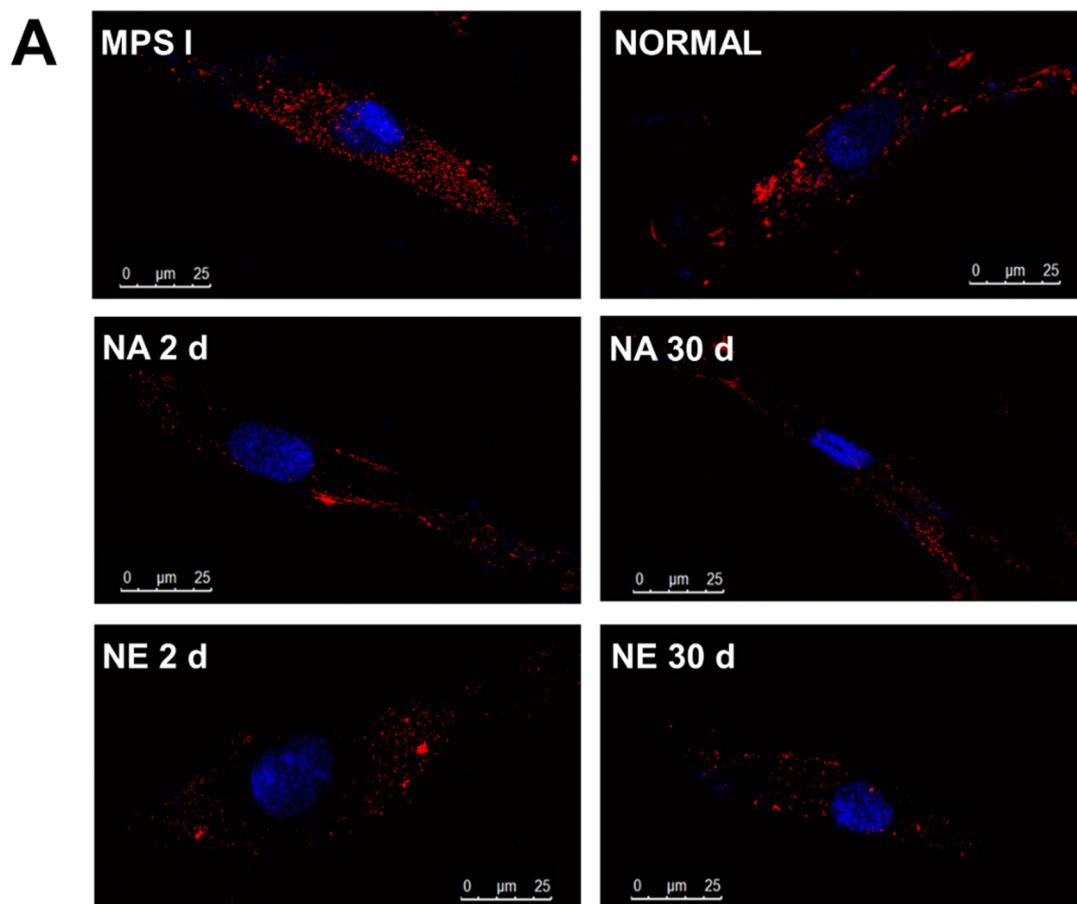


Figure 2.5. Lysosome staining. **(A)** Fibroblasts were labeled with LysoDeep®; images were acquired in fluorescence (Ex/ Em = 596/ 619 nm) and transmission channels with a 63x glycerin-immersion objective in a Leica Microsystems confocal microscope. Confocal microscopy images of untreated MPS I fibroblasts, normal fibroblasts, and MPS I fibroblasts 2 d and 30 d after NA or NE treatments. **(B)** Quantification of red stained area in the fibroblasts. * $p < 0.05$ compared to untreated MPS I cells. Scale bars, 25 μm ; magnification, 63x. NA = nanoemulsion/ adsorbed DNA; NE = nanoemulsion/ encapsulated DNA.

Flow cytometry

MPS I patient's fibroblasts treated with NA or NE complexes at +4/ -1 charge ratio were stained with LysoDeep® Cytointer and the fluorescence was analyzed with a flow cytometer (Figure 2.6). Untreated MPS I fibroblasts and normal fibroblasts were used as controls (Figure 2.6A). In figure 2.6B is possible to observe that there was a reduction in the fluorescence of lysosomes after 30 d of culture. The Figure 2.6C shows a representative histogram of NA and NE treatments at 2 d and 30 d after treatments, when compared to MPS I untreated fibroblasts. Confirming the results from the microscopy, a progressive reduction in the lysosome staining signal was observed, reaching levels similar to normal at 30 days of culture for both NA e NE formulations.

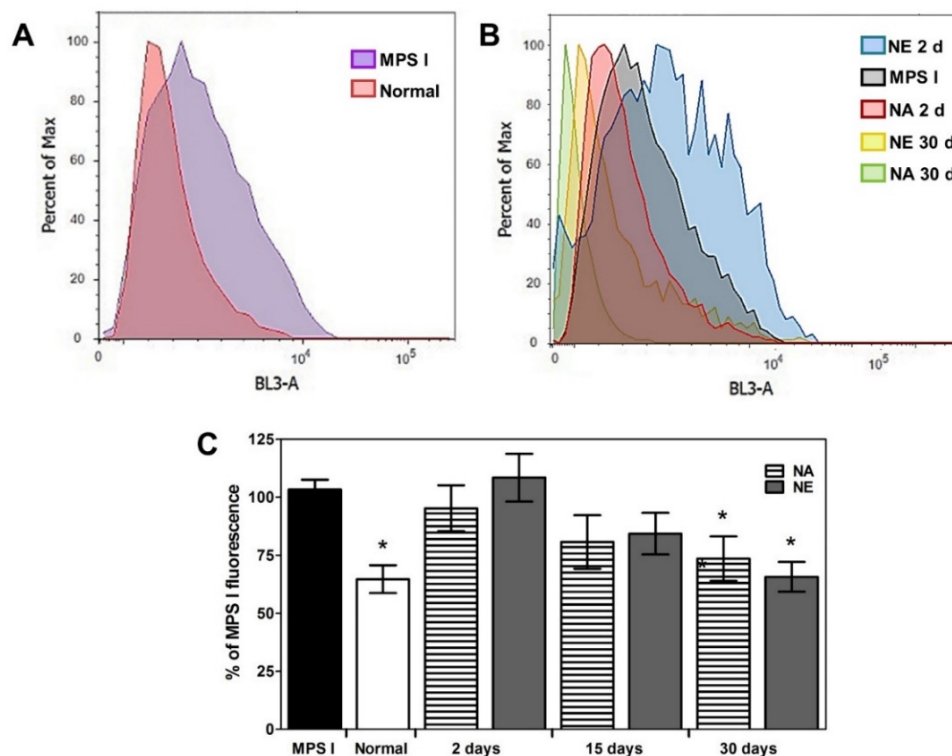


Figure 2.6. Representative histograms of lysosome dyed live cells analyzed for fluorescence intensity levels. **(A)** Comparison among MPS I and normal fibroblasts. **(B)** The NA and NE treated groups were compared to MPS I untreated group over time. **(C)** Percentage of fluorescence found in normal, NA (striped bars) and NE (dark grey bars) treatments at 2 d, 15 d, and 30 d of culture relative to MPS I fibroblasts. Values refer to average of the percentage of cells in each gate of three independent experiments \pm standard deviation. * $p < 0.05$ compared with control (one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc). NA = nanoemulsion/ adsorbed DNA; NE = nanoemulsion/ encapsulated DNA.

DISCUSSION

This set of experiments described the co-complexation of two DNA sequences, the plasmid encoding the CRISPR/Cas9 system and the p.Trp402* donor oligonucleotide onto cationic nanoemulsions. As the Cas9 nuclease cuts the two genomic DNA strands, a DNA template is needed to the homologous directed repair (HDR) of the genomic DNA. The two DNA sequences must be delivered to the cell, since without the CRISPR/Cas9 there would be no gene editing, and without the donor oligonucleotide there would be no recombination. Thus, in both cases the mutation would not be corrected. In this study, both nucleic acids were associated with nanoemulsions by adsorption (NA) or by encapsulation of preformed nucleic acids/DOTAP complexes (NE). The assessment of the extent of DNA complexation with nanoemulsions was performed through a mobility shift assay. Nucleic acids seem to be associated with nanoemulsions once no migration from complexes was detected in the electrophoresis gel. Further evidences of nucleic acids association with nanoemulsions (NA and NE) could also be detected by a significant reduction of the zeta potential of the nanostructures. The electrostatic interactions between positively charged DOTAP molecules and negatively charged phosphate groups in nucleic acids have been considered to be the main force behind nucleic acid complexation with nanotechnology-based systems [23,24].

Whatever the procedure used, the association of nucleic acids with nanoemulsions yielded monodisperse complexes ($IP < 0.2$) exhibiting 200nm in size, as estimated by PCS. No differences were detected between complexes obtained by adsorption or encapsulation, even after the association of a large size CRISPR/Cas9 plasmid (9.9 Kb). In addition, the size of the complexes remained quite similar after their incubation with DMEM or DMEM supplemented with 10% FBS over time. Such results could be related with the role of the polyethylene-glycol moiety of DSPE-PEG on the stabilization of complexes due to the steric hindrance preventing aggregation and neutralization of positive charge of the DNA/emulsion complex, especially in the presence of serum proteins and electrolytes [6, 21]. It is believed that the PEGylated lipid sterically keeps the approaching plasma proteins away from the surface by coating it with PEG in mushroom or brush conformation [25]. However, the adsorption of

proteins (from FBS) on nanocomplexes reduces progressively the zeta potential over time, leading to the charge inversion to negative values after 48h of incubation.

Complexes were further incubated in cell culture conditions to assess the extent of decomplexation of nucleic acids from NA and NE complexes, as well as the protection against nuclease degradation. Results clearly showed that nucleic acids were not released from both complexes after 1 h of incubation. However, nucleic acids were released from NA in the presence of serum proteins after 24h of incubation, whereas from NE, decomplexation of nucleic acids occur only after 48 h of incubation. These results demonstrate that DNA localization in the inner oil core of nanoemulsions may protect nucleic acids from degradation better than the adsorption on the surface, thus promoting longer lasting DNA complexation [20]. Our results also showed that degradation of nucleic acids in the presence of FBS 10% follow in line with their release from complexes. Some degradation can be observed for complexes obtained by adsorption at the interface of nanoemulsions (after 24 h of incubation) in comparison with the encapsulated ones (only after 48h of incubation).

In vitro experiments performed in human MPS I fibroblasts showed that NA and NE complexes were well tolerated by cells, demonstrating cell viability of about 80%. The transfection and correction efficiency of NA and NE complexes were evaluated by IDUA activity assay, which detected significant levels of IDUA in fibroblasts at 2 d after treatments, and were kept until 30 d of cell culture. The measurements in DMEM also showed a statistically significant increase. These results are important because they may infer that the enzyme produced by the corrected cells could be released to the culture medium. For treating MPS I, the correction of a few cells could lead to enzyme release into the medium and the IDUA may be taken up by the neighboring cells, resulting in widespread correction of the biochemical defects [11]. It has been reported that the presence of less than 1% of normal IDUA activity in patients is sufficient to moderate some of the severe clinical symptoms related to Hurler syndrome [26–28].

MPS I p.Trp402* (Hurler) is characterized by a near total absence of IDUA activity, leading to the accumulation of GAGs within the lysosomes. The higher levels of GAGs accumulation are associated with a superabundance of lysosomes with an abnormal morphology [28,29]. Thus, to assess if the treatments were capable to reduce the number of lysosomes and therefore to correct the cell phenotype, the cells were

incubated with LysoDeep® Red, a fluorescent dye that is endocytosed into the lysosomes. The confocal images showed that the two treatments were capable of reducing the fluorescence intensity attributed to the lysosomes when compared to the MPS I untreated fibroblasts. These results were confirmed by flow cytometry, demonstrating that the treatments promoted a significant reduction in the number of lysosomes to values similar to those of normal fibroblasts. These findings may be related to the phenomenon of cross-correction, which is the ability of enzyme-expressing cells to correct neighboring cells that are enzyme-deficient and are in agreement with the levels of IDUA activity [27,30].

The overall results reflect the efficient correction of the p.Trp402* mutation in fibroblasts of MPS I patients. After the analysis of the results, it was possible to assume that both nanoemulsions were effective for maintaining the enzymatic activity up to 30 d and for presenting a significant reduction in the number of lysosomes at 30 d after treatment. The production of IDUA enzyme and the reduction in the area of lysosomes proves the capacity of nanostructured carriers of co-delivering the CRISPR/Cas9 plasmid and the donor oligonucleotide, and shows the editing efficiency of this new gene therapy tool.

CONCLUSION

This study investigated the ability of nanoemulsions as nonviral carriers of the CRISPR/Cas9 plasmid and p.Trp402* donor oligonucleotide aiming for *in vitro* gene therapy for the multisystemic disease MPS I. The overall results showed that the administration of PEGylated nanostructured complexes led to an increase in IDUA activity in the fibroblasts and in the culture medium. The lysosomes of treated fibroblasts presented smaller areas when compared to MPS I cells analyzed by flow cytometry, what may infer that the treatments could correct the mutation, allowing cell production of functional IDUA, which was able to reduce lysosomal content. In addition, it is worth noticing that a small-sized formulation and the ability of complexation, protection and decomplexation of nucleic acids are requirements for transfection efficiency, thus NA is a good candidate especially for *in vitro* assessments. Regarding NE formulation, one can observe that the ability to complex with nucleic acids strongly and the protection of DNA in the presence of serum proteins makes this a more interesting formulation for *in vivo* studies. In conclusion, the set of results brings hope

to the treatment of MPS I by gene editing with nanoemulsions as nonviral carriers for the CRISPR/Cas9 system. These successful outcomes are highly encouraging for the development of new strategies to improve transfection efficiency. This study shows the feasibility of these complexes as nanotechnology-based carriers aiming for MPS I gene editing.

Declaration of interest

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/ Brazil) (grant numbers 470888/2014-8 and 141742/2014-3) and FIFE/HCPA (grant number 150416). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest.

REFERENCES

- [1] R. Giugliani, Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries, *Genet. Mol. Biol.* 35 (2012) 924–931.
- [2] U. Matte, G. Yogalingam, D. Brooks, S. Leistner, I. Schwartz, L. Lima, D.Y. Norato, J.M. Brum, C. Beesley, B. Winchester, R. Giugliani, J.J. Hopwood, Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients, *Mol. Genet. Metab.* 78 (2003) 37–43. doi:10.1016/S1096-7192(02)00200-7.
- [3] R. Giugliani, A. Federhen, M.V.M. Rojas, T. Vieira, O. Artigalás, L.L. Pinto, A.C. Azevedo, A. Acosta, C. Bonfim, C.M. Lourenço, C.A. Kim, D. Horovitz, D. Bonfim, D. Norato, D. Marinho, D. Palhares, E.S. Santos, E. Ribeiro, E. Valadares, F. Guarany, G.R. de Lucca, H. Pimentel, I.N. de Souza, J. Correa, J.C. Fraga, J.E. Goes, J.M. Cabral, J. Simionato, J. Llerena, L. Jardim, L. Giuliani, L.C.S. da Silva, M.L. Santos, M.A. Moreira, M. Kerstenetzky, M. Ribeiro, N. Ruas, P. Barrios, P. Aranda, R. Honjo, R. Boy, R. Costa, C. Souza, F.F. Alcantara, S.G.A. Avilla, S. Fagondes, A.M. Martins, Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment, *Genet. Mol. Biol.* 33 (2010) 589–604. doi:10.1590/S1415-47572010005000093.
- [4] C.E.M. Hollak, F.A. Wijburg, Treatment of lysosomal storage disorders: successes and challenges., *J. Inherit. Metab. Dis.* 37 (2014) 587–598. doi:10.1007/s10545-014-9718-3.
- [5] P. Patel, Y. Suzuki, A. Tanaka, H. Yabe, S. Kato, T. Shimada, R.W. Mason, K.E. Orii, T. Fukao, T. Orii, S. Tomatsu, Impact of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Therapy on Growth in Patients with Hunter Syndrome., *Mol. Genet. Metab. Reports.* 1 (2014) 184–196. doi:10.1016/j.ymgmr.2014.04.001.

- [6] G. Baldo, R. Giugliani, U. Matte, Gene delivery strategies for the treatment of mucopolysaccharidoses., *Expert Opin. Drug Deliv.* 11 (2014) 449–459. doi:10.1517/17425247.2014.880689.
- [7] H. Wang, H. Yang, C.S. Shivalila, M.M. Dawlaty, A.W. Cheng, F. Zhang, R. Jaenisch, One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering, *Cell.* 153 (2013) 910–918. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025.
- [8] P. Mali, L. Yang, K.M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J.E. DiCarlo, J.E. Norville, G.M. Church, RNA-guided human genome engineering via Cas9., *Science.* 339 (2013) 823–826. doi:10.1126/science.1232033.
- [9] L. Cong, F.A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P.D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L.A. Marraffini, F. Zhang, Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems., *Science.* 339 (2013) 819–823. doi:10.1126/science.1231143.
- [10] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity., *Science.* 337 (2012) 816–821. doi:10.1126/science.1225829.
- [11] L. Cong, F.A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P.D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L.A. Marraffini, F. Zhang, Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems., *Science.* 339 (2013) 819–823. doi:10.1126/science.1231143.
- [12] T.G. Carvalho, U. Silveira Matte, R. Giugliani, G. Baldo, Genome Editing: Potential Treatment for Lysosomal Storage Diseases, *Curr. Stem Cell Reports.* 1 (2015) 9–15. doi:10.1007/s40778-014-0007-8.
- [13] M.M. Nordling-David, G. Golomb, Gene Delivery by Liposomes, *Isr. J. Chem.* 53 (2013) 737–747. doi:10.1002/ijch.201300055.
- [14] D. Zhi, S. Zhang, S. Cui, Y. Zhao, Y. Wang, D. Zhao, The headgroup evolution of cationic lipids for gene delivery., *Bioconjug. Chem.* 24 (2013) 487–519. doi:10.1021/bc300381s.
- [15] L.M. Verissimo, L.F.A. Lima, L.C.M. Egito, A.G. de Oliveira, E.S.T. do Egito, Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy., *J. Drug Target.* 18 (2010) 333–342. doi:10.3109/10611860903434019.
- [16] M.D. Lavigne, D.C. Górecki, Emerging vectors and targeting methods for nonviral gene therapy, *Expert Opin. Emerg. Drugs.* 11 (2006) 541–557. doi:10.1517/14728214.11.3.541.
- [17] C. Janich, S.R. Pinnapireddy, F. Erdmann, T. Groth, A. Langner, U. Bakowsky, C. Wölk, Fast therapeutic DNA internalization – A high potential transfection system based on a peptide mimicking cationic lipid, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 118 (2017) 38–47. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.007.
- [18] H.Y. Nam, J.H. Park, K. Kim, I.C. Kwon, S.Y. Jeong, Lipid-based emulsion

- system as non-viral gene carriers., *Arch. Pharm. Res.* 32 (2009) 639–646. doi:10.1007/s12272-009-1500-y.
- [19] M. Fraga, T.G. de Carvalho, D. da S. Diel, N.A. Kretzmann Filho, H.F. Teixeira, U. Matte, Cationic Nanoemulsions as a Gene Delivery System: Proof of Concept in the Mucopolysaccharidosis I Murine Model., *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15 (2015) 810–816.
- [20] F. Bruxel, J.M.C. Vilela, M.S. Andrade, A. Malachias, C.A. Perez, R. Magalhaes-Paniago, M.C. Oliveira, H.F. Teixeira, Investigation of the structural organization of cationic nanoemulsion/antisense oligonucleotide complexes., *Colloids Surfaces B, Biointerfaces.* 112 (2013) 530–536. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.08.035.
- [21] M. Fraga, F. Bruxel, V.L. Lagranha, H.F. Teixeira, U. Matte, Influence of phospholipid composition on cationic emulsions/DNA complexes: physicochemical properties, cytotoxicity, and transfection on Hep G2 cells., *Int. J. Nanomedicine.* 6 (2011) 2213–2220. doi:10.2147/IJN.S22335.
- [22] M. Fraga, F. Bruxel, D. Diel, T.G. de Carvalho, C.A. Perez, R. Magalhaes-Paniago, A. Malachias, M.C. Oliveira, U. Matte, H.F. Teixeira, PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model., *J. Control. Release.* 209 (2015) 37–46. doi:10.1016/j.jconrel.2015.04.013.
- [23] M. Fraga, T.G. de Carvalho, J. Bidone, R.S. Schuh, U. Matte, H.F. Teixeira, Factors influencing transfection efficiency of pIDUA/nanoemulsion complexes in a mucopolysaccharidosis type I murine model., *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 2061–2067. doi:10.2147/IJN.S121558.
- [24] G. Baldo, F. Quoos Mayer, M. Burin, J. Carrillo-Farga, U. Matte, R. Giugliani, Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human mucopolysaccharidosis type I cells., *Cells. Tissues. Organs.* 195 (2012) 323–329. doi:10.1159/000327532.
- [25] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [26] S.M. Kwon, H.Y. Nam, T. Nam, K. Park, S. Lee, K. Kim, I.C. Kwon, J. Kim, D. Kang, J.H. Park, S.Y. Jeong, In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier., *J. Control. Release.* 128 (2008) 89–97. doi:10.1016/j.jconrel.2008.02.004.
- [27] C.-H. Liu, S.-Y. Yu, Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery., *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 79 (2010) 509–515. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.05.026.
- [28] R. Schuh, G. Baldo, H. Teixeira, Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses, *Expert Opin. Drug Deliv.* 13 (2016) 1709–1718. doi:10.1080/17425247.2016.1202235.
- [29] P. Di Natale, C. Di Domenico, G.R.D. Villani, A. Lombardo, A. Follenzi, L. Naldini,

In vitro gene therapy of mucopolysaccharidosis type I by lentiviral vectors., *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2764–2771.

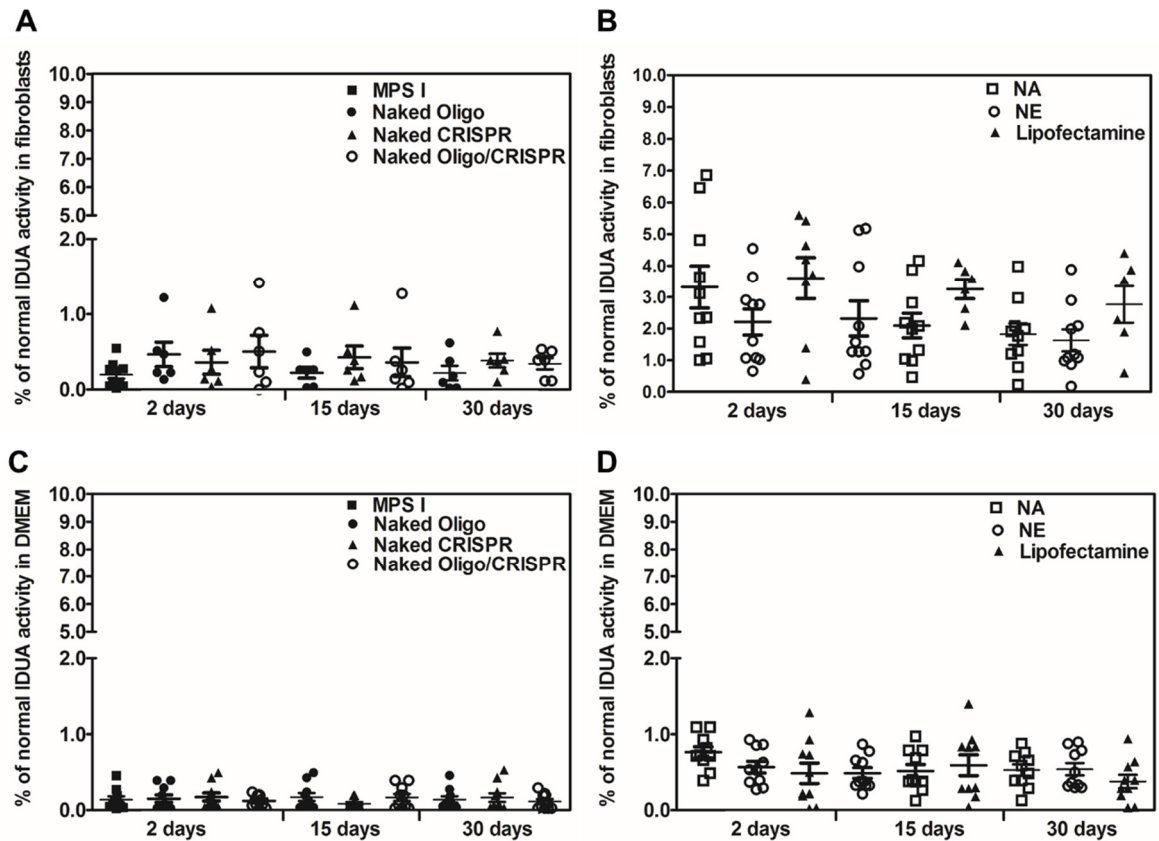
- [30] S.D. Hartung, R.G. Reddy, C.B. Whitley, R.S. McIvor, Enzymatic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts by adeno-associated virus-mediated transduction of the alpha-L-iduronidase gene., *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 2163–2172. doi:10.1089/10430349950017158.
- [31] K.M. Keeling, D.A. Brooks, J.J. Hopwood, P. Li, J.N. Thompson, D.M. Bedwell, Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation., *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 291–299.
- [32] P. Bioulac, M. Mercier, C. Beylot, D. Fontan, The diagnosis of mucopolysaccharidoses by electron microscopy of skin biopsies., *J. Cutan. Pathol.* 2 (1975) 179–190.
- [33] E.L. Aronovich, P.B. Hackett, Lysosomal storage disease: Gene therapy on both sides of the blood-brain barrier, *Mol. Genet. Metab.* 114 (2016) 83–93. doi:10.1016/j.ymgme.2014.09.011.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

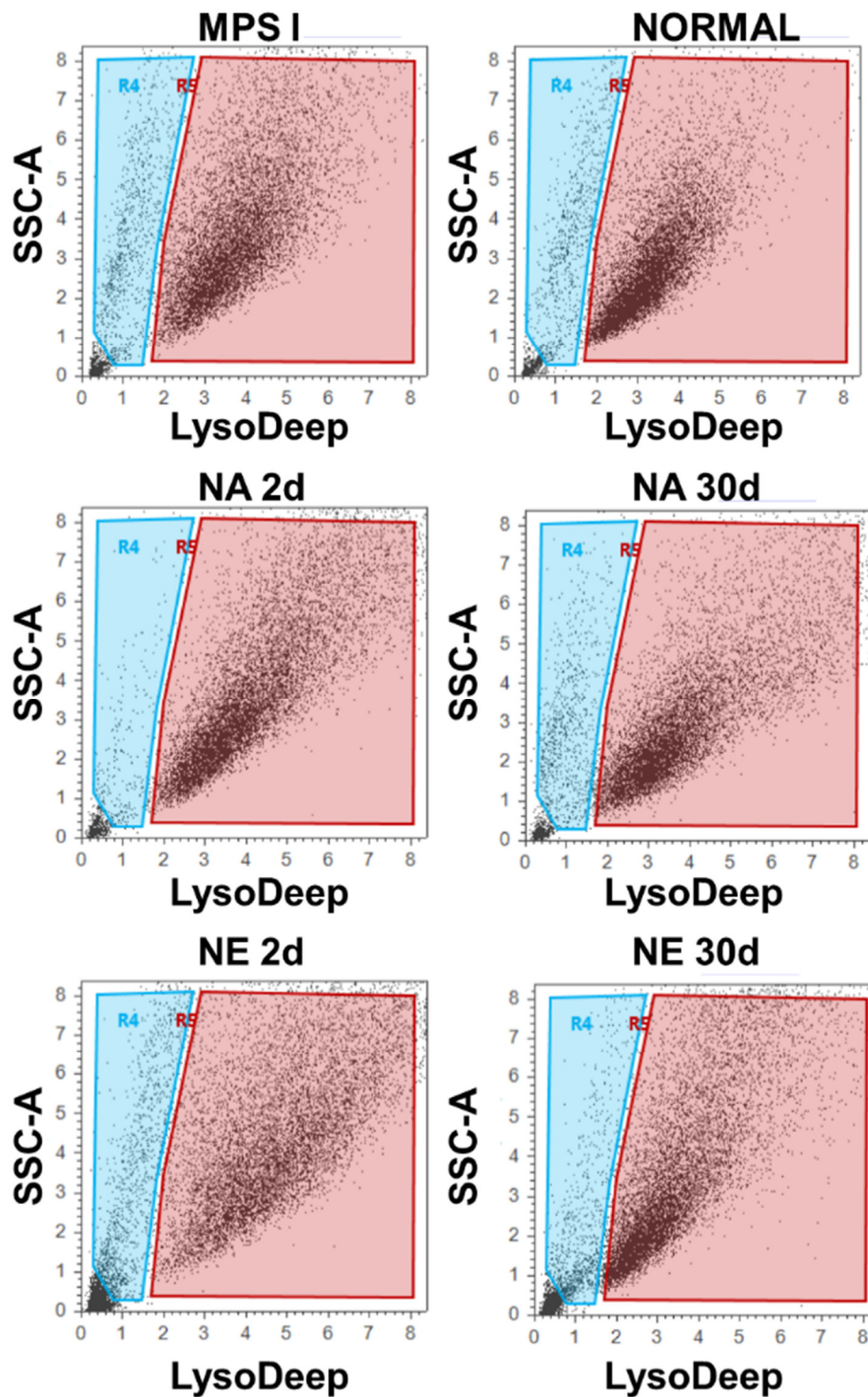
Suppl. Table 2.1. Prediction of possible off-target events in exons (crispr.mit.edu).

Locus	MM	Target sequence	Gene
chr1:-50887260	4 [3:5:9:17]	CGGCGCTTTGGCCTAGCGCGCGG	DMRTA2
chr1:-154127358	4 [2:5:14:20]	CTACCCTTCGGCCGAGAGCCAGG	NUP210L
chr1:-179263023	4 [1:3:14:19]	GGGCACTTCGGCCAAGAGGGCAG	GRCh38
chr14:+101004991	4 [1:3:15:16]	GGCCACTTCGGCCTCCAGCGGGG	BEGAIN
chr22:+38122486	4 [3:5:12:14]	CGCCTCTTCGGGCAAGAGCGCAG	TRIOBP
chr6:+106960649	4 [1:3:8:14]	GGGCACTGCGGCCGAGAGCGGGG	AIM1
chr8:+56436850	4 [1:10:11:20]	TGACACTTCATCCTAGAGCAGGG	XKR4

MM: mismatches.



Supplementary figure 2.1. Transfection efficiency *in vitro*: IDUA activity in human fibroblasts and in supernatant (secreted IDUA). (A) IDUA activity shown as percentage of activity found in normal fibroblasts or in (C) DMEM versus time of culture. Untreated MPS I fibroblasts (full squares), MPS I fibroblasts treated with naked Trp402* oligonucleotide (empty squares), MPS I fibroblasts treated with naked CRISPR plasmid (empty circles), and MPS I fibroblasts treated with naked CRISPR/Trp402* plasmid and oligonucleotide (full triangles), cultured for 2 days. (B) IDUA activity shown as percentage of activity found in normal fibroblasts or in (D) DMEM versus time of culture. MPS I fibroblasts treated with NA (empty squares), MPS I fibroblasts treated with NE (empty circles), and MPS I fibroblasts treated with Lipofectamine 3000™ (full triangles) cultured for 2, 15, and 30 days. Results represent the mean \pm standard error of the mean of ten experiments; * $p < 0.05$, compared to untreated MPS I fibroblasts or Lipofectamine 3000™ (Student's T test) or control groups (Anova, Dunn's post-hoc). NA: nanoemulsion adsorbed with CRISPR/Cas9 plasmid and Trp402* IDUA donor oligonucleotide for *in vitro* correction of human fibroblasts. NE: nanoemulsion encapsulated with CRISPR/Cas9 plasmid and Trp402* IDUA donor oligonucleotide for *in vitro* correction of human fibroblasts.



Supplementary figure 2.2. Representative dot plots of lysosome dyed live fibroblasts analyzed for fluorescence intensity levels (SSC-A versus FSC-A) of MPS I, normal, NA and NE at 2 d, and NA and NE at 30 d. The R5 pink area on the right was used as live gate.

3.1. INTRODUÇÃO

Neste terceiro capítulo, é demonstrada a produção de lipossomas e nanoemulsões por microfluidização e sua caracterização para utilização como carreadores do sistema CRISPR/Cas9, que pode envolver a complexação com somente um plasmídeo ou a co-complexação de um plasmídeo e um oligonucleotídeo. Os lipossomas (DOPE, DOTAP e DSPE-PEG) e nanoemulsões (DOPE, DOTAP, DSPE-PEG e TCM) foram preparados por microfluidização com variação do número de passagens no equipamento a fim de obter-se o menor tamanho de vesícula/gotícula. A complexação com o DNA foi obtida através da adsorção de um plasmídeo ou de uma mistura de plasmídeo e oligonucleotídeo em várias razões de carga para determinação da relação mais estável em que os ácidos nucleicos estão mais protegidos da degradação pela DNase I. Os principais resultados revelaram que o processo de microfluidização levou a uma redução do tamanho de partícula e índice de polidispersão quando comparado à homogeneização à alta pressão realizada no capítulo anterior. A incubação dos complexos com meio de cultura com e sem soro fetal bovino e também em soro de camundongos demonstrou que ocorre uma proteção dos ácidos nucleicos por até 24 h, evidenciando a liberação do plasmídeo após 24 h e do oligonucleotídeo após 48 h. Os complexos demonstraram manter a viabilidade celular acima de 70% e sua captação por três diferentes tipos celulares foi avaliada. Esses resultados demonstraram que os lipossomas produzidos com três passagens e as nanoemulsões com quatro passagens são capazes de proteger os ácidos nucleicos na relação de cargas +4/ -1, sendo internalizados pelas células em cerca de 30% (Hep-G2 e fibroblastos) e 90% (HEK-293). Entretanto, não houve diferença significativa entre a utilização de lipossomas ou nanoemulsões como carreadores, tampouco entre a associação de uma ou duas sequências de ácidos nucleicos de tamanhos diferentes, concluindo que não há implicações nesses quesitos para a utilização no sistema CRISPR/Cas9.

3.2. ARTIGO CIENTÍFICO

Physicochemical properties of cationic nanoemulsions and liposomes obtained by microfluidization complexed with a single plasmid or along with an oligonucleotide: implications for CRISPR/Cas technology
Submetido ao Materials Science and Engineering C

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF CATIONIC NANOEMULSIONS AND LIPOSOMES OBTAINED BY MICROFLUIDIZATION COMPLEXED WITH A SINGLE PLASMID OR ALONG WITH AN OLIGONUCLEOTIDE: IMPLICATIONS FOR CRISPR/CAS TECHNOLOGY

Roselena S. Schuh^{1,3}, Flávia N. S. Fachel¹, Édina Poletto^{2,3}, Ursula Matte^{2,3}, Guilherme Baldo^{2,3}, Helder F. Teixeira^{1,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Centro de Terapia Gênica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, R. Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Correspondence address:

Helder F. Teixeira

Avenida Ipiranga, 2752, ZIP Code: 90610-000 Porto Alegre/RS, Brazil. Telephone number: +55 51 33085090; fax: +55 51 33085437 e-mail address: helder.teixeira@ufrgs.br

ABSTRACT

In this study, we investigated the effects of the association of a single plasmid or its co-complexation along with an oligonucleotide on the physicochemical properties of cationic nanoemulsions and liposomes intended for gene editing. Formulations composed of DOPE, DOTAP, DSPE-PEG (liposomes), and MCT (nanoemulsions) were obtained by microfluidization. DSPE-PEG was found to play a crucial role on the size and polydispersity index of nanocarriers. Nucleic acids were complexed by adsorption at different charge ratios. No significant differences were noticed in the physicochemical properties of nanocarriers (i.e. droplet size, polydispersity index, or zeta potential) when a single plasmid or both plasmid and oligonucleotide were adsorbed with the formulations. Transmission electron microscopy photomicrographs suggested round nanostructures with the nucleic acids and DSPE-PEG enfolding the surface. Complexes at +4/-1 charge ratio protected nucleic acids against DNase I degradation. The oligonucleotide seemed to be released from the liposomal complexes, while nanoemulsions only released the plasmid after 24 and 48 h of incubation in DMEM supplemented or not. *In vitro* experiments demonstrated that complexes were highly tolerable to human fibroblasts, Hep-G2, and HEK-293 cells, demonstrating also an uptake ability of about 30 %, 30 %, and 90 %, respectively, no matter what the formulation or the combination of nucleic acids used. The overall results demonstrated the behavior of liposomes and nanoemulsions complexed with a plasmid or a mixture of a plasmid and an oligonucleotide, and demonstrated that the association with one or two nucleic acids sequences of different length does not seem to interfere in the physicochemical characteristics of complexes or in the uptake capacity by three different types of cells.

Keywords: nanoemulsion; liposome; co-complexation; CRISPR/Cas9; microfluidization; plasmid and oligonucleotide.

INTRODUCTION

Nucleic acids have been widely studied as alternative approaches to traditional treatments, such as DNA vaccines, treatments to knockout gene expression, and gene therapy. Although promising, these approaches face several limitations related to the polyanionic and instable character of these molecules, which may interact and aggregate with proteins, making it difficult to penetrate into cells through the plasma membrane [1,2]. In this sense, some strategies have been researched, such as the delivery of nucleic acids through the association with viral and nonviral vectors.

Nonviral lipid-based carriers are interesting alternatives, given that they are biocompatible, biodegradable, low immunogenicity, and low cost structures [2–4]. Among them, vesicles composed of one or more lipid bilayers are liposomes, whereas nanoemulsions comprise an oil core stabilized by an emulsifying layer. These structures may contain a cationic lipid that associates with the phosphate groups of nucleic acids through electrostatic interactions, allowing the complexation and protection of RNA or DNA sequences [5–7].

New gene therapy approaches may require the delivery of one or more nucleic acids into the cell nucleus. As an example, the CRISPR/Cas technology has been studied for genome editing in humans [8,9], requiring the delivery of at least one nucleic acid sequence, although it traditionally may require two: one encoding for the Cas9 protein and the other carrying the correct sequence for homologous recombination [10–12].

In the meantime, these complexes between nucleic acids and nanocarriers must be small-sized and stable to enhance the chances of penetration into the target cells. With the aim of optimizing these odds, the production of small nanostructures requires a high-pressure method to break down aggregates and to maximize the monodisperse distribution of droplets. Microfluidization is one of the best methods that fit in this category, as it forces the formulations into micro channels and homogenizes through a combined mechanism of cavitation, impact, and shear [13–15].

Based on this strategy, two nanocarriers were engineered to carry out the efficient delivery of a single plasmid or combined along with an oligonucleotide.

Therefore, this study aimed at investigating the physicochemical characteristics of cationic nanoemulsions and liposomes produced by microfluidization associated with a single CRISPR/Cas9 plasmid or co-complexed with the plasmid along with an oligonucleotide, and above all aims to demonstrate the behavior of these systems *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Vectors

The PrecisionXTM® CRISPR/Cas9 SmartNuclease system (System Biology, USA) was used on the experiments. In this system, the Cas9 nuclease and the guide RNA formed by a crRNA-tracrRNA transcript are present in a single vector. The plasmid was grown in transformed *Escherichia coli* Top 10 (Life Technologies, USA) using standard procedures and isolated using Maxi Prep® High Purity columns (Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. The extracted plasmid DNA was then sequenced by Sanger method to verify the correct orientation of the insert. For targeted recombination, a 134 base oligonucleotide was synthesized (a sequence homologous to the human alpha-L-iduronidase (IDUA) sequence).

Preparation of formulations and complexes

Preparation of formulations

Blank liposomes (L) were composed of 0.845 % (w/w) phospholipid 1,2-di-(9E-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) (Lipoid, Ludwigshafen, GER), 0.56 % (w/w) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane (DOTAP) (Lipoid, Ludwigshafen, GER), glycerol (Merck, Rio de Janeiro, BRA), and double-distilled water up to 100 %. For blank pegylated liposomes (LPeg), an equivalent amount of 0.285 % (w/w) of DOPE was replaced by 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (DSPE-PEG) (Lipoid, Ludwigshafen, GER).

Blank nanoemulsions (N) were composed of 0.845 % (w/w) DOPE (Lipoid, Ludwigshafen, GER), 0.56 % (w/w) DOTAP (Lipoid, Ludwigshafen, GER), 5.0 % (w/

w) MCT (Lipoid, Ludwigshafen, GER), glycerol (Merck, Rio de Janeiro, BRA), and double-distilled water up to 100 %. For blank pegylated nanoemulsion (NPeg), an equivalent amount of 0.285 % (w/w) of DOPE was replaced by DSPE-PEG (Lipoid, Ludwigshafen, GER).

For all formulations (L, LPeg, N, and NPeg), lipids were first dissolved in chloroform and evaporated under reduced pressure (40 °C). The lipid film was hydrated in an aqueous glycerol solution, vortexed for 1 min and left to stand overnight at 4 °C. On the following day, formulations were sonicated for 15 min at 38 °C. Then liposomes and nanoemulsions were passed through a LV-1 microfluidizer (Microfluidics, Ottawa, CAN) of a shear stress of 10,000 psi at various number of cycles varying from 1 to 5.

Preparation of complexes

Complexes were prepared by the adsorption of nucleic acids to blank formulations. DNA adsorption was performed by the addition of established amounts of plasmid to liposomes and nanoemulsions at room temperature, resulting in LP, LPegP, NP, and NPegP complexes. However, when the plasmid and the oligonucleotide were added to the formulations, LPO, LPegPO, NPO, and NPegPO complexes were formed. All the complexes were prepared at the theoretical +0.1/ -1, +1/ -1, +2/ -1, and +4/ -1 charge ratios (ratios of the positive charges from cationic lipids to the negative charges from DNA phosphate groups and DSPE-PEG).

Characterization of complexes

Physicochemical properties

The mean droplet size, polydispersity index, and ζ -potential of the formulations and complexes were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) at 90° and electrophoretic mobility measurements (3000HS Zetasizer, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The samples were diluted in water.

Nucleic acids complexation, decomplexation and stability

The complexation of the nucleic acids with the cationic formulations was verified by agarose gel electrophoresis. The complexes were electrophoresed in 1 % agarose gel stained with SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, USA). The extent of nucleic acids decomplexation was assessed in a similar way. The complexes were incubated in serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil), in DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, Brazil), or pure mice serum for 1, 24, and 48 h. Complexes were then loaded into a 1 % agarose gel and stained with SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, USA). Naked DNA was used as control. The stability of the DNA/formulation complexes was determined using a DNase I (Invitrogen, Carlsbad, USA) digestion assay. After their preparation, complexes were incubated with 1 U DNase I at 37 °C for 30 min. The samples were then subjected to phenol–chloroform extraction followed by agarose gel electrophoresis. Naked DNA with and without DNase I was used as control.

Morphology

The morphologic examination was evaluated by transmission electron microscopy (TEM). One drop of the formulations and complexes was placed on a carbon-coated copper grid (200 mesh), negative stained with a 2.0 % uranyl acetate solution and left to dry for 24 hours before the examination. A JEM-1200 EXII instrument (JEOL, Tokyo, JPN) operating at 80 kV was used for those analyzes.

***In vitro* experiments**

The fibroblasts were obtained from subjects under informed consent and the project was approved by the local ethics committee (CEUA/HCPA#150416). Hep-G2 (human hepatocellular carcinoma cell/ ATCC® HB-8065™) and Hek-293 (human normal epithelial embryonic kidney cell/ ATCC® CRL-1573™) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA). Cells were grown in DMEM supplemented with 10% (w/v) FBS (Gibco, Grand Island, NY). The cultures were

maintained in a humidified atmosphere at 37 °C, 5 % CO₂. The studies were performed as cells reached 60 – 70 % confluence.

Cell viability assay

The toxicity of the blank formulations and the complexes was assessed in human's fibroblasts, Hep-G2, and Hek-293. Cell viability was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, USB Corporation, Cleveland, USA) assay. Cells were cultivated in DMEM containing 10 % FBS and 1 % ampicillin / streptomycin, and seeded at a density of 1×10^4 cells/well in a 96-well plate. The cells were incubated at 37 °C with 5 % CO₂ for 24 hours before the assay. Increasing volumes of the complexes were incubated with the cells for 48 hours, then the medium was removed, and a 5 mg / mL MTT solution was added. Cells were incubated at 37 °C with 5 % CO₂ for 4 hours. After that, 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO, Synth Solutions, São Paulo, Brazil) were added to dissolve the blue formazan crystals. The optical density was measured at 570 nm using a plate reader (Anthos, Hamburg, GER). Cells incubated only in DMEM were used as a control for 100 % cellular viability, while 0 % of cellular viability was obtained after incubation of cells with Triton X-100 (2 %, w/v).

Cell uptake assay with NBD-PE labeled formulations

The NBD-PE (N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine, Triethylammonium Salt) labeled phospholipid (Thermo Fisher Scientific, USA) was dissolved in chloroform with the other lipids in the proportion of 1 mg/ ml of formulation replacing the same amount of DOPE. The preparation of the formulations continued as described to the blank liposomes (LPeg) and nanoemulsions (NPeg), and the adsorption of the plasmid generated the NBD-PE labeled LPegP and NPegP, or the co-complexation of the plasmid along with the oligonucleotide generated the NBD-PE labeled LPegPO and LPegNO. Cell uptake assay was performed after cell incubation with 60 µl of labeled complexes for 24 hours in serum-free DMEM. Fluorescent labeling was studied under epifluorescence microscope (Olympus-IX 71, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera using a plan-neofluar (Olympus-DP 71, Tokyo, Japan) objective (200x magnification).

Flow cytometry

After cell incubation with the NBD-PE labeled complexes, live cells were resuspended in phosphate buffered saline (PBS, Gibco, Grand Island, NY) and analyzed for fluorescence intensity levels with Invitrogen® Attune® NXT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA). First, an FSC/SSC gate was delineated to define a live gate analysis. Fluorescence intensity from samples was then compared by histogram analysis. The first comparison was among untreated and treated cells (n=3). Then the treated groups were compared to each other depending on the cell type. For each sample, 10,000 events were acquired.

Data analysis

Films obtained in agarose gel electrophoresis were scanned to capture their images. Optical density of each gel was measured using the NIH ImageJ 1.44b software. Results were expressed as the mean \pm standard deviation of at least three independent experiments. For statistical analysis, the GraphPad Prism software was used. Student's t test was used to compare mean droplet size, zeta potential, and cell viability; and one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc for cell uptake. Statistical differences among groups were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

Physicochemical properties of the formulations

Figure 3.1 shows the effect of the number of microfluidization cycles (1 to 5) on the droplet size and polydispersity of nanostructures. Coarse formulations were prepared by thin lipid film formation manufacturing process, which exhibited droplets of micrometric range ($>1.5 \mu\text{m}$). An increase in the number of microfluidization cycles led to a sharp and progressive reduction in droplet size to about 100-150 nm range.

Considering the same number of cycles, small-sized droplets were obtained when formulations contained DSPE-PEG, especially liposomes (LPeg). At the set condition which led to the smallest mean droplet size (marked with an asterisk in Figure 1), 3 cycles for liposomes (LPeg) and 5 cycles for nanoemulsions (NPeg), the polydispersity index was lower than 0.2.

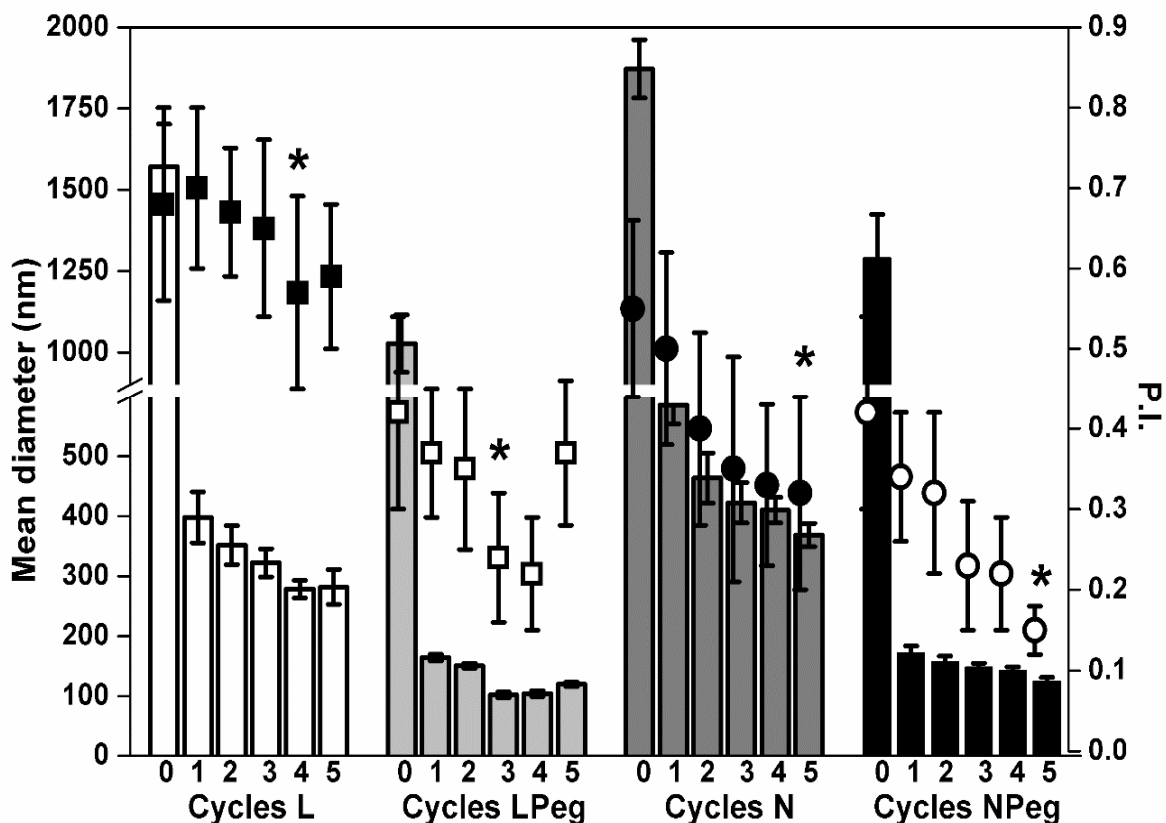


Figure 3.1. Mean droplet size distribution and P.I. of L, LPeg, N, and NPeg blank formulations according to the number of microfluidization cycles used for production. *Condition that led to the smallest mean droplet size. L = blank liposome, LPeg = blank liposome containing DSPE-PEG, N = blank nanoemulsion, NPeg = blank nanoemulsion containing DSPE-PEG, P.I. = polydispersity index.

The physicochemical properties of L, LP, LPO, LPeg, LPegP, and LPegPO were listed in Table 3.1; while the characterization of NP, NPP, NPO, NPeg, NPegP, and NPegPO complexes were described in Table 3.2.

Table 3.1. Physicochemical properties of L, LP, LPO, LPeg, LPegP, and LPegPO formulations and complexes at +0.1/ -1, +1/ -1, +2/ -1, and +4/ -1 charge ratios.

Formulation	Liposome (L)			PEG-Liposome (LPeg)		
	Droplet size (nm)	P.I.	ζ-Potential (mV)	Droplet size (nm)	P.I.	ζ-Potential (mV)
Blank	272.1 ± 30.0	0.57 ± 0.12	+26.5 ± 5.9	98.5 ± 1.0	0.22 ± 0.11	+38.3 ± 2.9
P +0.1/ -1	307.3 ± 21.2 ^a	0.59 ± 0.09	-18.7 ± 4.1 ^b	129.1 ± 2.8 ^a	0.25 ± 0.10	-19.13 ± 3.1 ^b
P +1/ -1	293.9 ± 22.7 ^a	0.56 ± 0.11	-13.5 ± 3.2 ^b	133.5 ± 2.2 ^a	0.23 ± 0.08	-6.5 ± 2.4 ^b
P +2/ -1	292.5 ± 23.1 ^a	0.55 ± 0.10	+4.2 ± 3.0 ^b	132.8 ± 1.5 ^a	0.20 ± 0.12	+16.2 ± 2.7 ^b
P +4/ -1	287.6 ± 33.1 ^a	0.60 ± 0.12	+8.3 ± 2.7 ^b	134.9 ± 2.3 ^a	0.18 ± 0.09	+29.3 ± 2.2 ^b
PO +0.1/ -1	281.9 ± 19.3 ^a	0.55 ± 0.14	-16.5 ± 5.9 ^b	129.1 ± 2.8 ^a	0.25 ± 0.10	-6.7 ± 1.9 ^b
PO +1/ -1	296.4 ± 24.1 ^a	0.52 ± 0.12	-8.7 ± 4.1 ^b	133.5 ± 2.2 ^a	0.23 ± 0.08	+2.5 ± 2.0 ^b
PO +2/ -1	283.0 ± 21.9 ^a	0.48 ± 0.14	+3.5 ± 3.2 ^b	132.8 ± 1.5 ^a	0.20 ± 0.12	+20.2 ± 2.6 ^b
PO +4/ -1	292.3 ± 33.5 ^a	0.49 ± 0.12	+10.2 ± 3.0 ^b	134.9 ± 2.3 ^a	0.18 ± 0.09	+36.0 ± 1.9 ^b

Results represent the mean ± standard deviation of three experiments; difference before and after complexation. Student's t-test, $p < 0.05$.

^a Mean diameter. ^b ζ-Potential. L = blank liposome, LPeg = blank liposome containing DSPE-PEG, P = single plasmid, PO = plasmid plus oligonucleotide, P.I. = polydispersity index.

Table 3.2. Physicochemical properties of N, NP, NPO, NPeg, NPegP, and NPegPO formulations and complexes at +0.1/ -1, +1/ -1, +2/ -1, and +4/ -1 charge ratios.

Formulation	Nanoemulsion (N)			PEG-Nanoemulsion (NPeg)		
	Droplet size (nm)	P.I.	ζ -Potential (mV)	Droplet size (nm)	P.I.	ζ -Potential (mV)
Blank	281.5 \pm 17.0	0.32 \pm 0.12	+26.5 \pm 2.9	138.5 \pm 12.0	0.15 \pm 0.03	+36.5 \pm 1.9
P +0.1/ -1	547.4 \pm 158.0 ^a	0.37 \pm 0.09	-25.7 \pm 4.1 ^b	211.4 \pm 10.3 ^a	0.21 \pm 0.07	-25.7 \pm 4.1 ^b
P +1/ -1	443.7 \pm 123.0 ^a	0.37 \pm 0.11	-13.5 \pm 3.2 ^b	228.7 \pm 15.0 ^a	0.23 \pm 0.08	-11.5 \pm 3.2 ^b
P +2/ -1	432.6 \pm 114.0 ^a	0.41 \pm 0.10	+10.2 \pm 3.0 ^b	195.3 \pm 13.0 ^a	0.22 \pm 0.05	+12.1 \pm 1.3 ^b
P +4/ -1	447.9 \pm 152.0 ^a	0.40 \pm 0.12	+18.3 \pm 3.7 ^b	164.2 \pm 12.0 ^a	0.24 \pm 0.04	+27.3 \pm 1.7 ^b
PO +0.1/ -1	427.1 \pm 127.0 ^a	0.33 \pm 0.10	-17.7 \pm 3.1 ^b	196.1 \pm 14.2 ^a	0.15 \pm 0.08	-12.3 \pm 3.1 ^b
PO +1/ -1	433.5 \pm 118.0 ^a	0.33 \pm 0.08	-15.5 \pm 5.0 ^b	226.5 \pm 10.0 ^a	0.23 \pm 0.06	-8.6 \pm 1.8 ^b
PO +2/ -1	432.8 \pm 116.0 ^a	0.40 \pm 0.12	+11.2 \pm 4.7 ^b	180.4 \pm 17.3 ^a	0.22 \pm 0.08	+13.9 \pm 1.7 ^b
PO +4/ -1	429.9 \pm 132.0 ^a	0.43 \pm 0.09	+19.1 \pm 2.7 ^b	156.1 \pm 10.1 ^a	0.21 \pm 0.09	+30.3 \pm 2.2 ^b

Results represent the mean \pm standard deviation of three experiments; difference before and after complexation. Student's t-test, $p < 0.05$.

^a Mean diameter. ^b ζ -Potential. N = blank nanoemulsion, NPeg = blank nanoemulsion containing DSPE-PEG, P = single plasmid,

PO = plasmid plus oligonucleotide, P.I. = polydispersity index.

Mean droplet size of L and N was about 280 nm, while the values for the pegylated formulations LPeg and NPeg were contrasting, as they presented smaller droplets (98 and 138 nm, respectively). The mean droplet size of all liposomes and nanoemulsions tended to increase with the addition of the nucleic acids. However, there was no statistical difference between the formulations containing a single plasmid or co-complexed with a plasmid and an oligonucleotide.

The polydispersity index was lower for the complexes containing DSPE-PEG (LPeg, LPegP, LPegPO, NPeg, NPegP, and NPegPO) when compared to the formulations L, LP, LPO, N, NP, and NPO, that presented polydisperse populations of nanostructures. Blank formulations L, LPeg, N, and NPeg showed a positive ζ -potential higher than +26 mV, which significantly decreased when a single plasmid or both plasmid and oligonucleotide were added to the formulations (LP, LPegP, NP, NPegP, LPO, LPegPO, NPO, and NPegPO).

Considering the characterization results, especially the increased size and polydispersity index, all formulations and complexes without DSPE-PEG in the composition were removed from the following experiments due to stability issues.

Loading and stability of complexes

The migration of nucleic acids from LPegP, LPegPO, NPegP, and NPegPO complexes produced at +0.1/ -1, +1/ -1, +2/ -1, and +4/ -1 charge ratios can be observed in Figure 3.2A. Only the complexes at +4/ -1 charge ratio were totally (100 %) retained at the application sites, indicating high stability of the association between the nucleic acids and the nanostructures, as estimated by using the software ImageJ.

The complexes were assessed for their ability to protect the nucleic acids from degradation in the presence of DNase I. The presence of bands of intact CRISPR/Cas9 plasmid and oligonucleotide could be observed after incubation with DNase I, indicating that the interactions between the nucleic acids and the cationic formulations were strong enough to protect against enzymatic degradation over a 30-minute period. As can be seen in figure 3.2B, the naked plasmid and naked plasmid/oligonucleotide bands presented high degradation after the incubation with DNase I. The presence of intact bands of the plasmid in LPegP and NPegP (Figure 3.2B, on the left), and the

presence of intact plasmid/oligonucleotide bands in LPegPO and NPegPO complexes (Figure 3.2B, on the right) after DNA extraction, demonstrated the ability of these nanostructures to efficiently protect the nucleic acids from degradation.

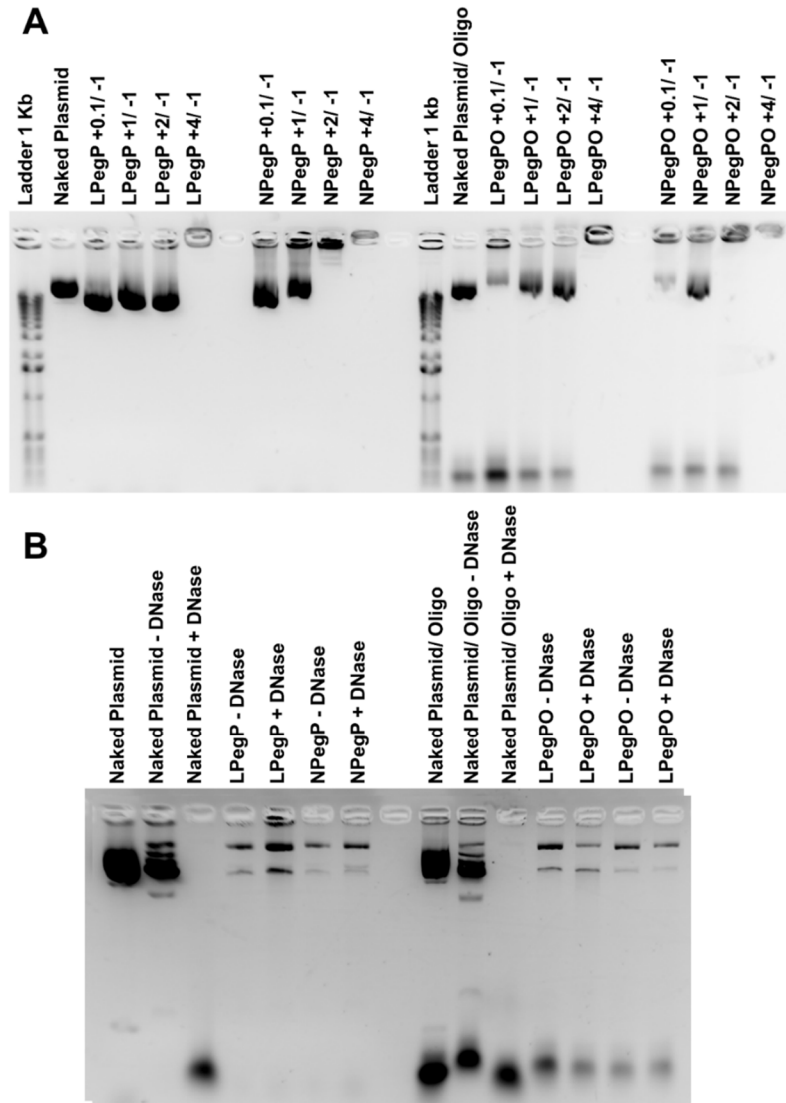


Figure 3.2. Migration of the CRISPR/Cas9 plasmid and the oligonucleotide from complexes and after 30 min of incubation with DNase I. (A) Migration of DNA from LPegP, LPegPO, NPegP, and NPegPO complexes at +0.1/ -1, +1/ -1, +2/ -1, and +4/ -1 charge ratios. (B) The same complexes at +4/ -1 charge ratio were incubated for 30 min with DNase I and submitted to phenol/chloroform extraction. Naked plasmid = free CRISPR/Cas9 plasmid, Naked Plasmid/ Oligo = free CRISPR/Cas9plasmid/ oligo, (-) DNase = incubation without DNase I, (+) DNase = incubation with DNase I.

Morphological Analysis

The morphology of lipid nanostructures was evaluated by TEM (Figure 3.3). In general, the photomicrographs showed spherical structures with a mean diameter

range between 100 and 200 nm, with a well-defined interface, especially NPeg and LPeg droplets. The photomicrographs suggested the formation of a thicker and more disorganized layer around the formulations, which modified somewhat its rounded shape, evidenced when the formulations were associated with the nucleic acids.

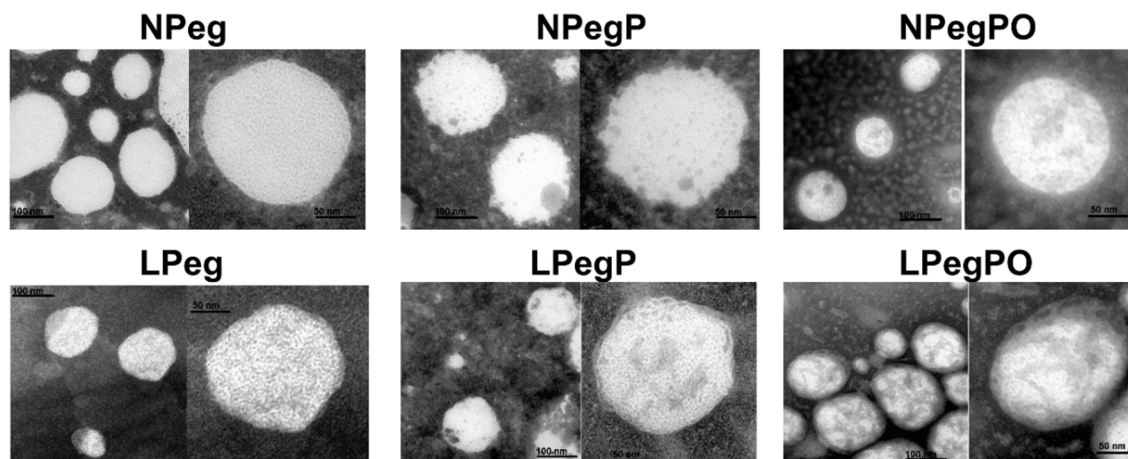


Figure 3.3. Transmission electron (TEM) photomicrographs of NPeg, NPegP, NPegPO, LPeg, LPegP, and LPegPO at +4/ -1 charge ratio obtained after negative staining with uranyl acetate at 80 Kv with magnification of 100,000 and 500,000x. NPeg = nanoemulsion with DSPE-PEG; LPeg = liposome with DSPE-PEG; NPegP = nanoemulsion complexed with plasmid; LPegP = liposome complexed with plasmid; NPegPO = nanoemulsion complexed with both plasmid and oligonucleotide; LPegPO = liposome complexed with both plasmid and oligonucleotide.

Decomplexation of nucleic acids

Nucleic acids decomplexation and the physicochemical properties of the complexes (mean droplet size and ζ -potential) were evaluated after incubation in serum-free DMEM, DMEM supplemented with 10 % FBS, or pure mouse serum at 1 h (Figure 3.4 A, B, C, and D), 24 h (Figure 3.5 A, B, C, and D), and 48 h (Figure 3.6 A, B, C, and D). Bands of free plasmid (10 Kb, Naked P) were placed near NPegP and LPegP stains, while bands of free plasmid/oligonucleotide (10 Kb and 134 bp, Naked PO) were placed near NPegPO and LPegPO stains, aiming to enable proper comparison and identification of which nucleic acid sequence was released from the complexes and migrated in the gel. After 1h of incubation, it was possible to observe that the nucleic acids were firmly complexated with all the formulations incubated in pure or supplemented DMEM (Figures 3.4A and B), although slight bands of free plasmid could be seen after NPegPO and LPegPO incubation only in mouse serum,

demonstrating some degree of plasmid release from complexes (Figure 3.4B). Figures 3.4C and D showed that the droplet size of all complexes remained stable, around 150 nm. In the meantime, zeta potential showed a decrease to negative values.

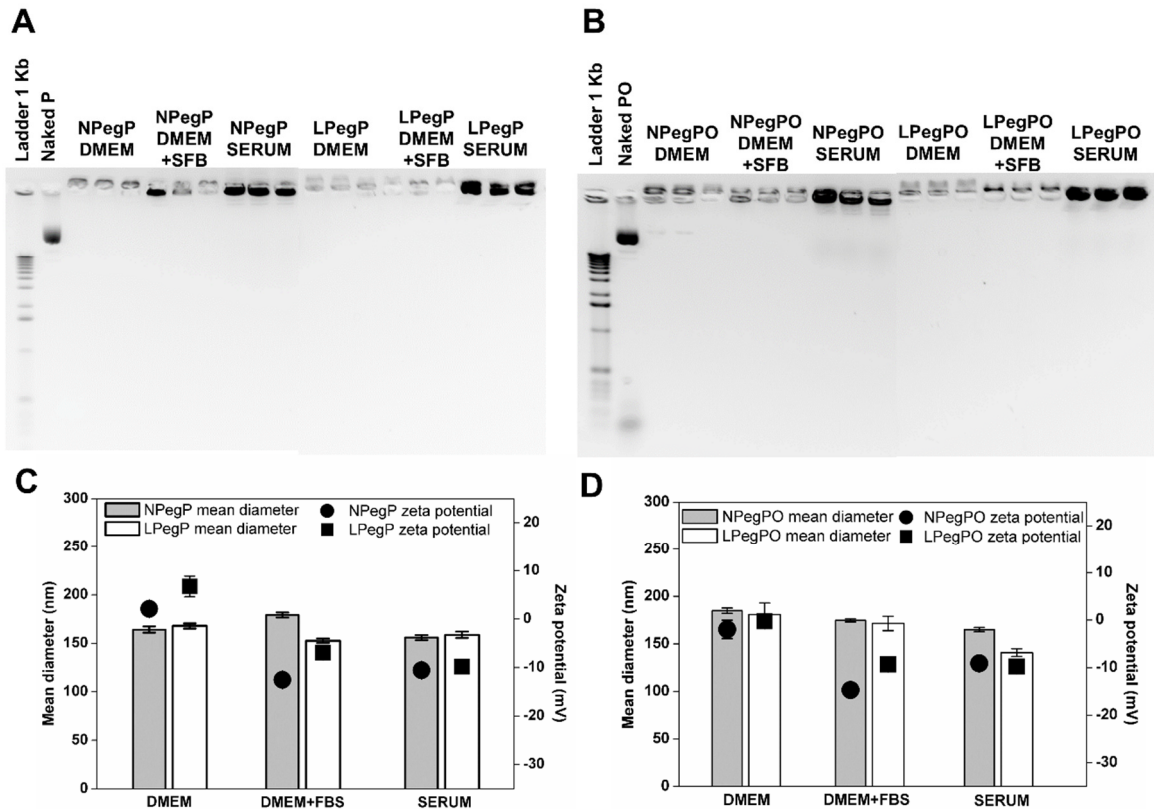


Figure 3.4. CRISPR/Cas9 plasmid and oligonucleotide decomplexation after 1 h of incubation in DMEM, DMEM supplemented with 10 % FBS or pure mouse serum. Plasmid migration from NPegP and LPegP after 1 h (A) of incubation, and both plasmid and oligonucleotide migration from NPegPO and LPegPO after 1 h (B) of incubation. Mean diameter (bars) and ζ -potential (circles or squares) of NPegP (grey bars and circles) and LPegP (white bars and squares) after 1 h (C) of incubation and the same measurements for NPegPO (grey bars and circles), and LPegPO (white bars and squares) after 1 h (D) of incubation. Results represent the mean \pm standard deviation of three experiments. Naked P=free plasmid; Naked PO=free plasmid and oligonucleotide; NPegP = nanoemulsion complexed with plasmid; LPegP = liposome complexed with plasmid; NPegPO = nanoemulsion complexed with both plasmid and oligonucleotide; LPegPO = liposome complexed with both plasmid and oligonucleotide. All complexes were produced at +4/ -1 charge ratio.

After 24 h of incubation in pure or supplemented DMEM, the adsorbed plasmid was decomplexated from all the complexes, as could be observed by the free plasmid bands in Figures 3.5A and B. In the meantime, migration of free oligonucleotide occurred only from LPegPO complexes, while NPegPO complexes still maintained the

association with the short length nucleic acids (Figure 3.5A). In addition, it is worth noticing that after 24 h of incubation in pure mouse serum, all complexes demonstrated undistinguished nucleic acids release, with a very slight degree of degradation (Figures 3.5A and B). Figures 3.5C and D showed that the droplet size and zeta potential of all complexes remained stable.

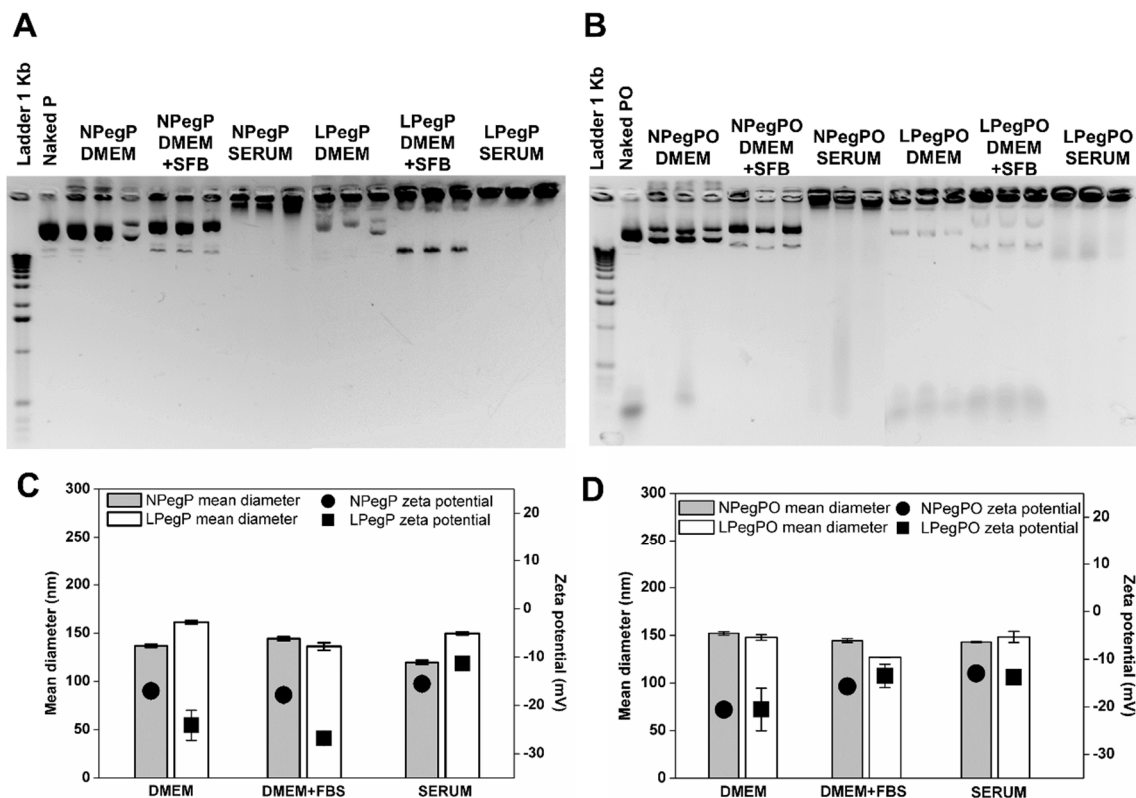


Figure 3.5. CRISPR/Cas9 plasmid and oligonucleotide decomplexation after 24h of incubation in DMEM, DMEM supplemented with 10 % FBS or pure mouse serum. Plasmid migration from NPegP and LPegP after 24 h (A) of incubation, and both plasmid and oligonucleotide migration from NPegPO and LPegPO after 24 h (B) of incubation. Mean diameter (bars) and ζ -potential (circles or squares) of NPegP (grey bars and circles) and LPegP (white bars and squares) after 24 h (C) of incubation and the same measurements for NPegPO (grey bars and circles), and LPegPO (white bars and squares) after 24 h (D) of incubation. Results represent the mean \pm standard deviation of three experiments. Naked P = free plasmid; Naked PO = free plasmid and oligonucleotide; NPegP = nanoemulsion complexed with plasmid; LPegP = liposome complexed with plasmid; NPegPO = nanoemulsion complexed with both plasmid and oligonucleotide; LPegPO = liposome complexed with both plasmid and oligonucleotide. All complexes were produced at +4/ -1 charge ratio.

After 48 hours of incubation, the decomplexation profile of 24 h was maintained, except for the complexes incubated in pure mouse serum, which continued to release nucleic acids, although the spots have evolved to strongly stained bands of degraded

and fragmented DNA (Figures 3.6A and B). The droplet size and zeta potential of complexes (Figures 3.6C and D) remained similar to the values observed after 1 h of incubation (3.4C and D).

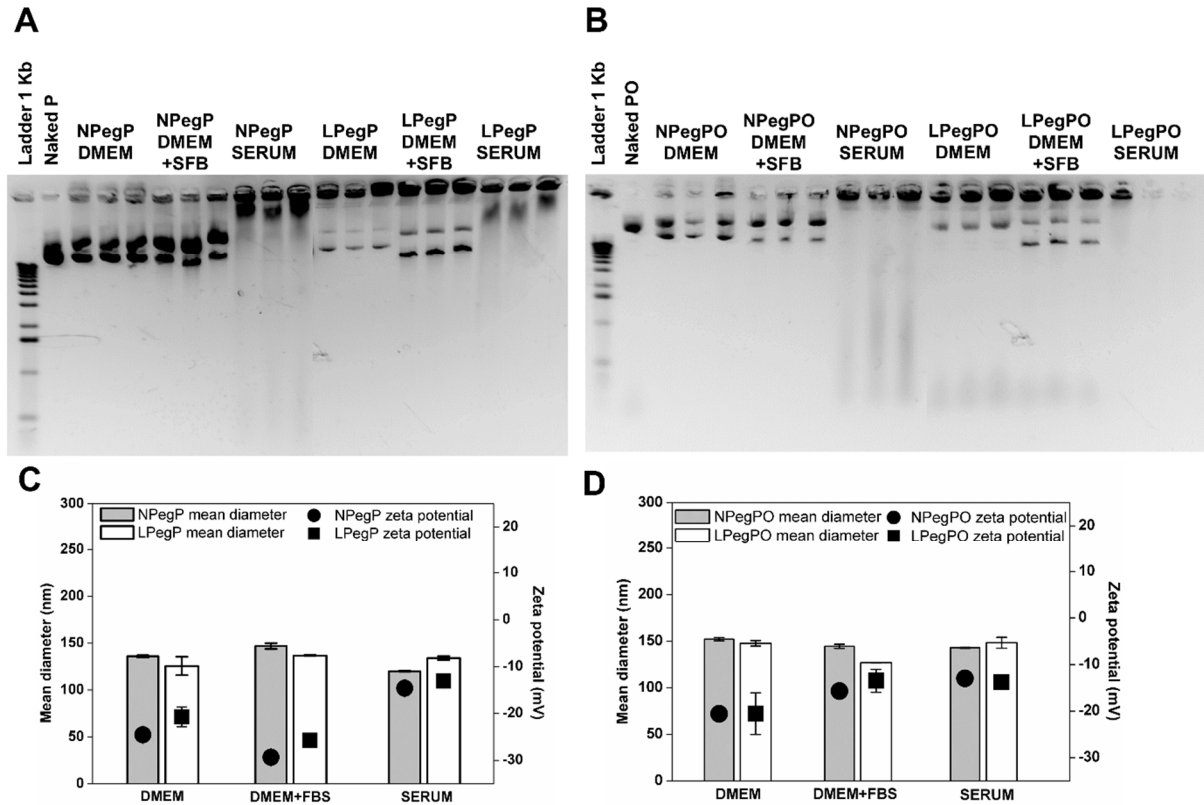


Figure 3.6. CRISPR/Cas9 plasmid and oligonucleotide decomplexation after 48 h of incubation in DMEM, DMEM supplemented with 10 % FBS or pure mouse serum. Plasmid migration from NPegP and LPegP after 48 h (A) of incubation, and both plasmid and oligonucleotide migration from NPegPO and LPegPO after 48 h (B) of incubation. Mean diameter (bars) and ζ -potential (circles or squares) of NPegP (grey bars and circles) and LPegP (white bars and squares) after 48 h (C) of incubation and the same measurements for NPegPO (grey bars and circles), and LPegPO white bars and squares) after 48 h (D) of incubation. Results represent the mean \pm standard deviation of three experiments. Naked P = free plasmid; Naked PO = free plasmid and oligonucleotide; NPegP = nanoemulsion complexed with plasmid; LPegP = liposome complexed with plasmid; NPegPO = nanoemulsion complexed with both plasmid and oligonucleotide; LPegPO = liposome complexed with both plasmid and oligonucleotide. All complexes were produced at +4/ -1 charge ratio.

***In vitro* assays**

Cell viability assay

The cell viability assay demonstrated that the addition of increasing amounts of

formulations still led to high cell viability of human fibroblasts, HEK-293, and Hep-G2 cells (Figure 3.7).

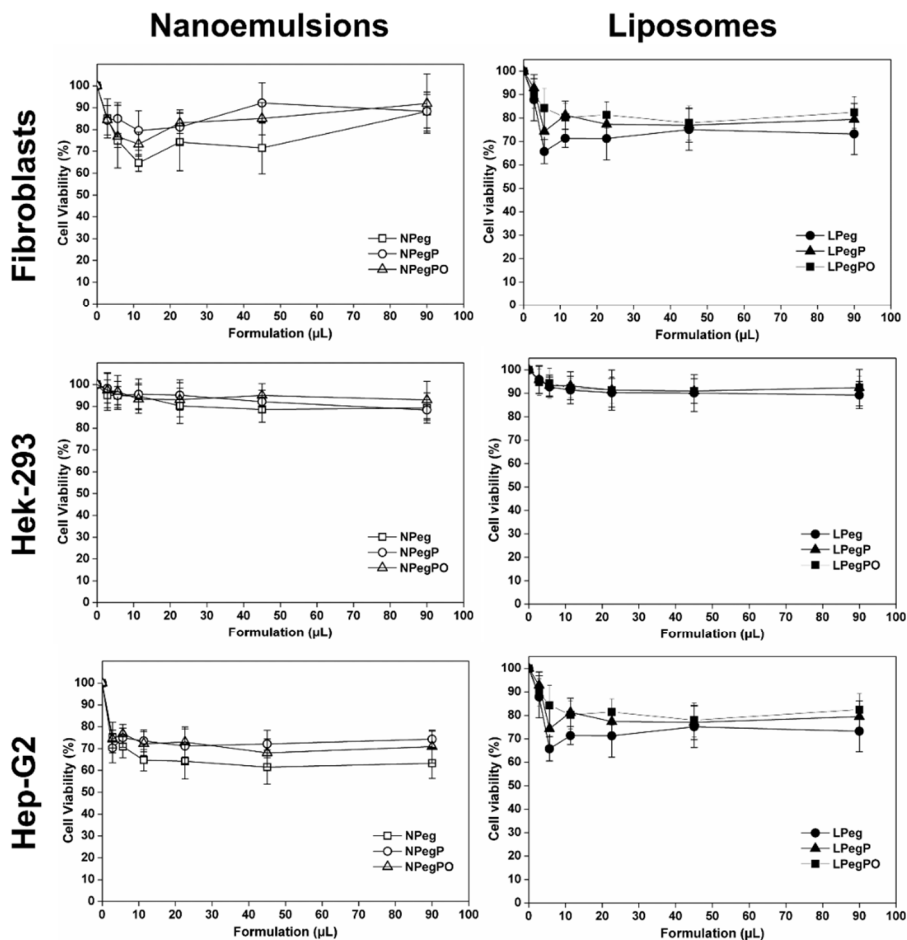


Figure 3.7. Cell viability after incubation of increasing volumes of NPeg (empty squares), NPegP (empty circles), NPegPO (empty triangles), LPeg (full circles), LPegP (full triangles), and LPegPO (full squares) complexes with human fibroblasts, HEK-293, and Hep-G2 cells. Results represent the mean \pm standard deviation of three experiments. NPeg = nanoemulsion with DSPE-PEG; LPeg = liposome with DSPE-PEG; NPegP = nanoemulsion complexed with plasmid; LPegP = liposome complexed with plasmid; NPegPO = nanoemulsion complexed with both plasmid and oligonucleotide; LPegPO = liposome complexed with both plasmid and oligonucleotide.

Among the formulations and complexes evaluated, the blank formulations NPeg and LPeg demonstrated the lower values of cell viability, although it was not significantly different from the results obtained for the complexes. Cell viability after cell incubation with the complexes was higher than 60% for fibroblasts and Hep-G2, and 90% for HEK-293. However, the five treatments did not show statistical difference among formulations ($p > 0.05$).

Cell uptake assay with NBD-PE labeled formulations

The cell uptake assay was performed with fibroblasts, HEK-293, and Hep-G2 cells (Figure 3.8).

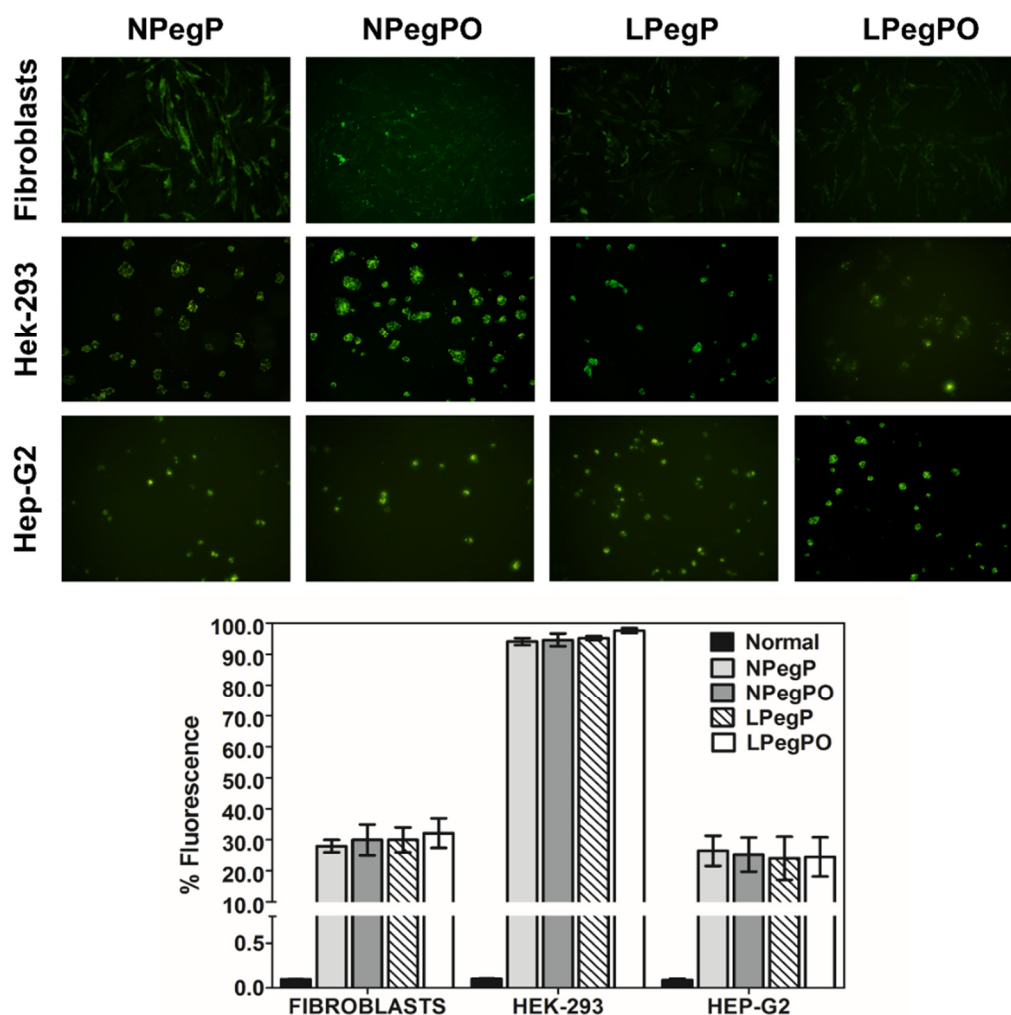


Figure 3.8. Cell uptake assay with NBD-PE labeled NPEgP, NPEgPO, LPegP, and LPegPO complexes analyzed under a fluorescence microscope after 24 h of incubation (magnification 200x). The graph represents the percentage of fluorescence found in untreated normal cells (black bars), and cells incubated with NPEgP (light grey bars), NPEgPO (dark grey bars), LPegP (white/black striped bars), or LPegPO (white bars) complexes. Values refer to average of the percentage of cells in live gate after three independent experiments \pm standard deviation. * $p < 0.05$ compared with untreated normal control cells (one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc). NPEgP = nanoemulsion complexed with plasmid; LPegP = liposome complexed with plasmid; NPEgPO = nanoemulsion complexed with both plasmid and oligonucleotide; LPegPO = liposome complexed with both plasmid and oligonucleotide.

Fibroblasts, HEK-293, and Hep-G2 cells were incubated with NBD-PE labeled liposome or nanoemulsion associated with a single plasmid or a plasmid along with an oligonucleotide, and analyzed under a fluorescence microscope. Representative images of the green fluorescence of NBD-PE green-labeled liposome/nucleic acids complexes (LPegP and LPegPO) and nanoemulsion/nucleic acids complexes (NPegP and NPegPO) could be observed after cell internalization (Figure 3.8, 200x magnification). To better quantify the cell uptake events, flow cytometry was performed. The percentage of fluorescent events was about 30 % for human fibroblasts and Hep-G2 cells, while it was 90 % for HEK-293 cells.

DISCUSSION

CRISPR/Cas9 technology may require the delivery of a single plasmid or a mixture of a plasmid along with an oligonucleotide into the target cell for an efficient gene editing therapy. In this study, we aimed to characterize the physicochemical properties of complexes formed by the association of nanocarriers and one or two nucleic acids of different length, as well as their toxicity and uptake in different cell lines.

Prior to complexes formation, the microfluidization operating conditions leading to the smallest monodisperse droplet or vesicle size were determined. A progressive reduction of mean size and polydispersity index was noticed with the increasing number of microfluidization cycles, especially for DSPE-PEG-containing formulations (NPeg and LPeg). In the set conditions, it is worth noticing that nanoemulsions were larger-sized than liposomes, probably due to the presence of MCT in their inner core, which limits particle disruption through microfluidization [16]. However, droplet size was markedly smaller when compared to the ones obtained in previous high-pressure homogenization studies from our research group [6,17].

Complexes were obtained at different charge ratios by adding increasing amounts of a single plasmid or along with an oligonucleotide to blank liposomes or nanoemulsions. Our results showed that DSPE-PEG played a crucial role on the size and homogeneity of the complexes, as higher (from 0.33 to 0.48) polydispersity indexes were noticed for all complexes prepared without DSPE-PEG. Previous literature has shown that pegylated phospholipids on the nanostructures' surface

provides a strong repulsion that could overcome the attractive Van der Waals forces, thus stabilizing the preparations by avoiding aggregation and leading to small-sized nanostructures [18–20]. TEM photomicrographs corroborated the mean droplet size estimated by PCS analyzes and suggested that the regularly spherical surface of NPeg and LPeg structures contrasted with the rough surface observed for all the complexes. Dehydration and shrinkage of the vesicles' hydrophilic PEG chains may occur when the nucleic acids are added to the formulations, a common effect known to be associated with the negative-stain TEM techniques [21–24].

The extent of nucleic acids complexation with liposomes and nanoemulsions was verified by agarose gel electrophoresis. No differences were noticed when a single plasmid or a mixture of plasmid/oligonucleotide was associated to the nanostructures. However, it must be mentioned that a complete retention of nucleic acids at the application site was observed only for complexes prepared at the highest charge ratio (+4/ -1). Even if nucleic acids may interact with the different lipids (phospholipids and PEGylated phospholipids) located at the outer layers of nanostructures [25,26], electrostatic interactions established between nucleic acids and the cationic lipid DOTAP seem to play the main role in this association. Such interactions were found to be strong enough to prevent the massive decomplexation of nucleic acids from nanocarriers for up to 24 h of incubation. This assumption was based on the presence of intact bands retained at the application points, demonstrating that the plasmid and/or the oligonucleotide were, at least partially, protected and might still be viable to fulfill their role in genomic editing.

The release of nucleic acids from positively charged lipid carriers occurs especially after dilution in cell culture conditions due to the presence of competing electrolytes and/or proteins of DMEM and FBS. The adsorption of these compounds on the surface of both liposomes and nanoemulsions was suggested by the lowering of ζ -potential of nanocarriers right after incubation. However, DSPE-PEG may act as a barrier, reducing the kinetics of nucleic acids release. It is believed that nanostructures could sterically keep the approaching plasma proteins away from the surface when coated with PEG in mushroom or brush conformations [20,27]. However, when incubated in pure mouse serum, nucleic acids decomplexated from the nanostructures

and the effects of nucleases were noticed, as the degradation of nucleic acids started to happen.

Special attention should be given to the decomplexation of nucleic acids after 24 h of incubation in pure or supplemented DMEM. The release of the CRISPR/Cas9 plasmid from all the complexes was observed. However, in the case of the oligonucleotide, only liposomes (LPegPO) exhibited the corresponding bands of decomplexation, while nanoemulsions (NPegPO) still seemed to retain the oligonucleotide firmly associated after 48 h. One may speculate that a different interaction between the nanoemulsion and the short length nucleic acids may be occurring. In fact, regardless the surface charge, the size and organization of the nanostructures appear to be directly involved in the decomplexation of nucleic acids of different length. We assume that as liposomes are composed of lipid bilayers or multilayers, it is likely that a partition between the lipid components may occur, making it possible to have less cationic charges available at the external interface when compared to nanoemulsions, which are composed of a single lipid layer [26,28,29]. The theoretical lower number of positive charges available on the external interface of the liposome may result in more transient, weaker interactions with the nucleic acids, which would have less interaction points and might be more easily released from the liposomal complex. Another hypothesis would be the occurrence of interactions between the positively charged lipids and the short length oligonucleotides, which might cause a partial neutralization of the cationic charges forming a hydrophobic complex that would have greater affinity for the internal oil phase that might promote a slower rate of oligonucleotide release [6,26,28].

After demonstrating the physicochemical stability of the complexes, the *in vitro* assays were performed with the purpose of determining their safety and their ability to penetrate through cell membranes. Firstly, cell viability was shown to be high (60 % for fibroblasts and Hep-G2, and 90 % for HEK-293), as all the complexes demonstrated low toxicity. When matching cell viability and cell uptake results, one could observe that fibroblasts and Hep-G2 cells seemed to be more difficult to transfect, as only around 30 % of live cells were fluorescent, but maybe it occurs due to the lower viability of these types of cells. On the opposite, HEK-293 cells showed more than 90 % fluorescent cells, demonstrating that this cell line might more easily uptake the

nanostructures and complexes, and maintain high viability. However, there was no significant difference among all the groups of complexes when the same cell type was analyzed.

It is worth noticing that the plasmid and the oligonucleotide should be protected with the purpose of being delivered intact within the cells. This study showed that liposomes and nanoemulsions could efficiently protect and deliver the nucleic acids, as the decomplexation and cell uptake assays demonstrated, although these abilities were not dependent on the nucleic acid length. The overall results demonstrated that the charge ratio might be the main force that determines what the physicochemical characteristics of the complexes are, while the length of the nucleic acids associated with the formulations did not seem to be so important to affect some properties as mean diameter, polydispersity index, zeta potential, complexation, and decomplexation of nucleic acids. Cell viability and cell uptake also depended on the cell type, but the nanostructure or the nucleic acid length did not seem to play a decisive role in the results.

CONCLUSION

This study investigated the feasibility of liposomes and nanoemulsions as nonviral carriers of the single CRISPR/Cas9 plasmid or co-complexated with an oligonucleotide. One may notice that the co-complexation of two different DNA constructs is not well reported in the literature. The overall results showed that there is no impactful difference between nanoemulsions and liposomes regarding the physicochemical properties of resulting formulations. Both nanostructured complexes led to high cell viability of human fibroblasts, Hep-G2, and HEK-293 cells and these complexes were efficiently uptaken by these cells. This work is highly important as it demonstrated that there was no significant difference between the complexation of a single plasmid or along with an oligonucleotide, as the charge ratio may be the most important variable to be considered when delivering nucleic acids for gene editing with the CRISPR/Cas9 system.

Declaration of interest

The authors were supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant numbers 470888/2014-8 and 141742/2014-3) and FIFE/HCPA. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest.

REFERENCES

- [1] C.-H. Liu, S.-Y. Yu, Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery., *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 79 (2010) 509–515. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.05.026.
- [2] M.M. Nordling-David, G. Golomb, Gene Delivery by Liposomes, *Isr. J. Chem.* 53 (2013) 737–747. doi:10.1002/ijch.201300055.
- [3] D.B. Fenske, P.R. Cullis, Entrapment of small molecules and nucleic acid-based drugs in liposomes., *Methods Enzymol.* 391 (2005) 7–40. doi:10.1016/S0076-6879(05)91001-X.
- [4] R. Schuh, G. Baldo, H. Teixeira, Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses, *Expert Opin. Drug Deliv.* 13 (2016) 1709–1718. doi:10.1080/17425247.2016.1202235.
- [5] F. Bruxel, J.M.C. Vilela, M.S. Andrade, A. Malachias, C.A. Perez, R. Magalhaes-Paniago, M.C. Oliveira, H.F. Teixeira, Investigation of the structural organization of cationic nanoemulsion/antisense oligonucleotide complexes., *Colloids Surfaces B, Biointerfaces*. 112 (2013) 530–536. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.08.035.
- [6] M. Fraga, F. Bruxel, D. Diel, T.G. de Carvalho, C.A. Perez, R. Magalhaes-Paniago, A. Malachias, M.C. Oliveira, U. Matte, H.F. Teixeira, PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model., *J. Control. Release*. 209 (2015) 37–46. doi:10.1016/j.jconrel.2015.04.013.
- [7] S.E. McNeil, Y. Perrie, Gene delivery using cationic liposomes, *Expert Opin. Ther. Pat.* 16 (2006) 1371–1382. doi:10.1517/13543776.16.10.1371.
- [8] L. Cong, F.A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P.D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L.A. Marraffini, F. Zhang, Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems., *Science*. 339 (2013) 819–823. doi:10.1126/science.1231143.
- [9] P. Mali, L. Yang, K.M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J.E. DiCarlo, J.E. Norville, G.M. Church, RNA-guided human genome engineering via Cas9., *Science*. 339 (2013) 823–826. doi:10.1126/science.1232033.

- [10] T.G. Carvalho, U. Silveira Matte, R. Giugliani, G. Baldo, Genome Editing: Potential Treatment for Lysosomal Storage Diseases, *Curr. Stem Cell Reports*. 1 (2015) 9–15. doi:10.1007/s40778-014-0007-8.
- [11] J.D. Sander, J.K. Joung, CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting., *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 347–55.
- [12] H. Yin, W. Xue, S. Chen, R.L. Bogorad, E. Benedetti, M. Grompe, V. Koteliansky, P.A. Sharp, T. Jacks, D.G. Anderson, Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype., *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 551–553. doi:10.1038/nbt.2884.
- [13] B. Yu, R.J. Lee, L.J. Lee, Microfluidic Methods for Production of Liposomes, *Methods Enzymol.* 465 (2009) 129–141. doi:10.1016/S0076-6879(09)65007-2.
- [14] S. Mahdi Jafari, Y. He, B. Bhandari, Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison, *Int. J. Food Prop.* 9 (2006) 475–485. doi:10.1080/10942910600596464.
- [15] M.L. Bondi, E.F. Craparo, Solid lipid nanoparticles for applications in gene therapy: a review of the state of the art, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 7–18. doi:10.1517/17425240903362410.
- [16] S. Sadeghpour Galooyak, B. Dabir, Three-factor response surface optimization of nano-emulsion formation using a microfluidizer, *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015) 2558–2571. doi:10.1007/s13197-014-1363-1.
- [17] M. Fraga, T.G. de Carvalho, J. Bidone, R.S. Schuh, U. Matte, H.F. Teixeira, Factors influencing transfection efficiency of pIDUA/nanoemulsion complexes in a mucopolysaccharidosis type I murine model., *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 2061–2067. doi:10.2147/IJN.S121558.
- [18] O.K. Nag, V. Awasthi, Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior, *Pharmaceutics.* 5 (2013) 542–569. doi:10.3390/pharmaceutics5040542.
- [19] C. Lovelyn, A. Attama, Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery, *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 2 (2011) 626–639.
- [20] M.L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel, Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential, *Int. J. Nanomedicine.* 1 (2006) 297–315.
- [21] L. Cheng, F.-Z. Huang, L.-F. Cheng, Y.-Q. Zhu, Q. Hu, L. Li, L. Wei, D.-W. Chen, GE11-modified liposomes for non-small cell lung cancer targeting: preparation, ex vitro and in vivo evaluation., *Int. J. Nanomedicine.* 9 (2014) 921–935. doi:10.2147/IJN.S53310.
- [22] Y. Yang, J. Wang, H. Shigematsu, W. Xu, W.M. Shih, J.E. Rothman, C. Lin, Self-assembly of size-controlled liposomes on DNA nanotemplates, *Nat. Chem.* 8 (2016) 476–483. doi:10.1038/nchem.2472.
- [23] V. Klang, N.B. Matsko, C. Valenta, F. Hofer, Electron microscopy of

nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment., *Micron*. 43 (2012) 85–103. doi:10.1016/j.micron.2011.07.014.

- [24] M. Rasoulianboroujeni, G. Kupgan, F. Moghadam, M. Tahriri, A. Boughdachi, P. Khoshkenar, J.J. Ambrose, N. Kiaie, D. Vashae, J.D. Ramsey, L. Tayebi, Development of a DNA-liposome complex for gene delivery applications., *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 75 (2017) 191–197. doi:10.1016/j.msec.2017.02.012.
- [25] H. Teixeira, V. Rosilio, A. Laigle, J. Lepault, I. Erk, D. Scherman, S. Benita, P. Couvreur, C. Dubernet, Characterization of oligonucleotide/lipid interactions in submicron cationic emulsions: influence of the cationic lipid structure and the presence of PEG-lipids., *Biophys. Chem.* 92 (2001) 169–181.
- [26] H. Teixeira, C. Dubernet, V. Rosilio, A. Laigle, J.R. Deverre, D. Scherman, S. Benita, P. Couvreur, Factors influencing the oligonucleotides release from O-W submicron cationic emulsions., *J. Control. Release.* 70 (2001) 243–255.
- [27] C.-L. Chan, R.N. Majzoub, R.S. Shirazi, K.K. Ewert, Y.-J. Chen, K.S. Liang, C.R. Safinya, Endosomal escape and transfection efficiency of PEGylated cationic liposome–DNA complexes prepared with an acid-labile PEG-lipid, *Biomaterials*. 33 (2012) 4928–4935. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.038.
- [28] H. Teixeira, C. Dubernet, F. Puisieux, S. Benita, P. Couvreur, Submicron cationic emulsions as a new delivery system for oligonucleotides., *Pharm. Res.* 16 (1999) 30–36.
- [29] E. Martini, E. Fattal, M.C. de Oliveira, H. Teixeira, Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies., *Int. J. Pharm.* 352 (2008) 280–286. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.10.032.

4.1. INTRODUÇÃO

*Neste quarto capítulo, são apresentados os resultados relativos à injeção hidrodinâmica dos lipossomas caracterizados no capítulo anterior, co-complexados aos plasmídeos do sistema CRISPR/Cas9 e doador da sequência do gene *Idua* tendo como alvo a recombinação homóloga no locus *ROSA26* para edição gênica em camundongos *MPS I* neonatos. Tendo em vista que a correção gênica em modelo animal murino adulto somente tem capacidade de promover a melhora clínica de alguns sintomas, existe a possibilidade de administração hidrodinâmica em camundongos neonatos, o que aumentaria a eficiência de correção do defeito genético antes da manifestação dos sintomas da doença, promovendo o aumento da produção vitalícia de IDUA. A injeção hidrodinâmica é uma opção atraente para a administração de vetores não-virais contendo o gene de interesse pois tem demonstrado promover maior expressão gênica principalmente no fígado devido a sua arquitetura única de direcionamento. O alvo do sistema CRISPR/Cas9 no genoma dos camundongos é o locus *ROSA26*, amplamente utilizado para alcançar expressão gênica generalizada e seguro para a inserção de transgene. A partir dos resultados da caracterização físico-química obtidos no capítulo anterior e considerando o modelo de injeção hidrodinâmica neonatal, este estudo foi realizado somente com os lipossomas por terem menor tamanho de vesícula, menor índice de polidispersão e menor concentração de lipídios. Como principais resultados, demonstrou-se que os complexos foram capazes de transfectar fibroblastos de pacientes *MPS I*, que produziram IDUA funcional por até 30 dias, promovendo a melhora do fenótipo celular. Já os resultados *in vivo* demonstraram que os complexos possuem maior afinidade pelo pulmão, coração e fígado, apresentando aumento significativo da atividade enzimática sérica e tecidual, com promoção da redução dos GAGs teciduais e urinários seis meses após a injeção neonatal. Este capítulo demonstrou que os complexos são efetivos *in vitro* e *in vivo*, abrindo um leque de possibilidades para sua utilização no tratamento da *MPS I*.*

4.2. ARTIGO CIENTÍFICO

In vivo gene editing of mucopolysaccharidosis I mice using the CRISPR/Cas9 system

Submetido ao Journal of Controlled Release

IN VIVO GENE EDITING OF MUCOPOLYSACCHARIDOSIS I MICE USING THE CRISPR/CAS9 SYSTEM

Roselena Silvestri Schuh^{1,2}, Édina Poletto^{1,4}, Talita G. de Carvalho^{1,4}, Fabíola Meyer², Roberto Giugliani^{1,4}, Ursula Matte^{1,4}, Helder Ferreira Teixeira², Guilherme Baldo^{1,3,4,#}

¹*Centro de Terapia Gênica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, R. Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.*

²*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.*

³*Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, R. Sarmiento Leite, 500, 90035-190, Porto Alegre, RS, Brazil.*

⁴*Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.*

Corresponding author: Guilherme Baldo

E-mail: gbaldo@hcpa.edu.br

Telephone: +55 51 33598838

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a multisystemic disorder caused by the deficiency of alpha-L-iduronidase (IDUA) that leads to intracellular accumulation of glycosaminoglycans (GAGs). In the present study we aimed to use cationic liposomes carrying the CRISPR/Cas9 plasmid and a donor vector for *in vitro* and *in vivo* MPS I gene editing. The liposomal formulation composed of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane (DOTAP), and 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino (polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG) was prepared by microfluidization. Complexes were obtained by the adsorption of DNA at +4/ -1 charge ratio. The overall results showed complexes of about 110 nm, with positive zeta potential of +30 mV. The incubation of the complexes with fibroblasts from MPS I patients led to a significant increase in IDUA activity and reduction of lysosomal abnormalities. We also performed hydrodynamic injection of the liposomal complex in newborn MPS I mice. There was a significant increase in serum levels of IDUA, which was maintained during six months of evaluation. The fluorescent complexes were markedly localized in the lungs and heart, corroborating the results of increased IDUA activity and decreased GAGs storage especially in these tissues, while the group that received the naked plasmids presented increased enzyme activity especially in the liver. The production of IDUA in cells and in multiple organs had a significant beneficial effect on the characteristics of MPS I fibroblasts and of MPS I mice, which may bring hope to gene therapy of patients with Hurler disease.

Keywords: CRISPR/Cas; Gene therapy; Liposome; Lysosomal storage disease; Mucopolysaccharidosis type I; Nonviral vector.

INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I, OMIM #607014 #607015 #607016) is an autosomal recessive lysosomal storage disease (LSD) caused by the widespread accumulation of the glycosaminoglycans (GAGs) heparan and dermatan sulfate, which are partially degraded or not degraded due to a deficiency of the enzyme alpha-L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76). This abnormal GAGs storage interferes with normal functioning of cells, tissues, and organs, leading to organomegaly, skeletal deformities, cardiac abnormalities, and developmental delay [1]. Among the MPS I *IDUA* variants, Trp402* is the most prevalent mutation in patients, which do not produce IDUA protein, and is associated with very severe clinical manifestations in homozygotes [2].

Enzyme replacement therapy (ERT) and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) are the two treatments currently available for MPS I. However, these therapies are not completely effective as ERT is not capable of crossing the blood–brain barrier (BBB) or has difficulty to reach some tissues, while HSCT shows to have a considerable morbimortality, being effective to prevent the neurological regression only if performed in early years [3–5]. In this sense, novel and alternative therapies are required, and one of the most promising is gene therapy.

Ideally, this treatment would provide permanently adequate levels of the deficient enzyme to prevent excessive lysosomal storage. Gene therapy could be effective either by delivery of the gene directly to cells or by crossed provision of enzyme from other corrected cells acting as an IDUA source. Lysosomal enzymes are present in relatively low content, so little expression levels may lead to IDUA secretion that can be taken up by neighboring cells through mannose 6-phosphate (M6P) receptors [6].

Several studies of gene therapy *in vitro* and in animal models of MPS I have been performed using viral [7–9] or nonviral vectors [10,11]. As a few examples, Fraga et al. demonstrated increased levels of IDUA expression in MPS I mice after intravenous injections of cationic nanoemulsions associated with a plasmid [12–14]. Kobayashi et al. performed neonatal gene therapy of MPS I mice by intravenous injection of a lentiviral vector, which had a significant beneficial effect on the phenotypic abnormalities of MPS I [15]. In the meantime, novel approaches of gene therapy are

arising, as the CRISPR/Cas technology, which appears as an interesting candidate for genome editing [16–18]. This system requires two components: the RNA-guided DNA endonuclease Cas9 protein that cleaves DNA, and a variable CRISPR RNA (crRNA) and a trans-activating crRNA (tracrRNA) duplex that promotes DNA target recognition of the specific genome site [19]. These components will cleave DNA at a specific point and when a homologous sequence is provided along with the system (called “donor sequence”) part of the cells will undergo homologous recombination, inserting the donor sequence into the cell’s genome.

There are few studies reporting the delivery of the CRISPR/Cas9 system by hydrodynamic injection [20] and by combined viral and nonviral delivery of CRISPR system components *in vivo* [21], although there is no report about its use as *in vivo* gene therapy for MPS or even any LSD to date. MPS I gene editing via the CRISPR/Cas system could restore cellular IDUA production, enabling GAGs degradation. However, the delivery of the CRISPR/Cas system also demands studies, as nucleic acids must penetrate cells to function properly. In this sense, this work uses liposomal carriers considering their main advantages, as low immunogenicity, large-scale manufacture, low price, and the ability to carry and protect large nucleic acid constructs [22].

In this study, we evaluated the potential to perform MPS I gene therapy by *in vitro* transfection of fibroblasts from MPS I patients, and direct *in vivo* neonatal hydrodynamic injection of a liposomal carrier complexed with the CRISPR/Cas9 system, using an *Idua* gene knockout murine model.

MATERIALS AND METHODS

Vectors

Vectors for *in vitro* experiments

The PrecisionX CRISPR/Cas9 SmartNuclease™ system (System Biosciences, USA) was used for *in vitro* genome editing experiments. In this system, the Cas9 nuclease and guide RNA formed by a crRNA-tracrRNA transcript are present in a single vector. A 20 bp target sequence adjacent to a NGG (PAM sequence) which is

16 nucleotides distant from the mutated base on Trp402* was selected with the aid of an online software (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu>) (Supplementary Figure 4.1A). Sense and antisense oligonucleotides were synthesized, annealed and ligated to the vector that encodes the Cas9. The plasmid was grown in transformed *Escherichia coli* Top 10 (Life Technologies, USA) using standard procedures and isolated using Maxi Prep™ High Purity columns (Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. The extracted plasmid DNA was then sequenced by Sanger method to verify the correct orientation of the insert.

For targeted recombination, a 134-base oligonucleotide homologous to the Trp402* region was synthesized with the changed base in this mutation replaced by the correct nucleotide (called donor oligonucleotide). To avoid cleavage of the oligonucleotide by Cas9, as it contains the target region recognized by the nuclease, a G to A transversion creating a silent mutation modified the PAM sequence in the donor oligonucleotide (Supplementary Figure 4.1B).

Vectors for *in vivo* experiments

The same PrecisionX CRISPR/Cas9 SmartNuclease™ system (System Biosciences, USA) was used for *in vivo* genomic editing experiments, except that the target sequence for cleavage by the Cas9, 5'ggattctcccaggcccaggg3', was selected at the ROSA26 locus of the mouse genome and was inserted into the vector [23].

For homologous recombination, a vector containing the *Idua* cDNA that was customized by the company System Biosciences (USA) was used. The construct contains the mouse *Idua* cDNA sequence regulated by an EF promoter and two homologous regions (approximately 1 Kb each) to the ROSA26 locus of mice, in the region that Cas9 recognizes and cleaves (Supplementary Figure 4.2). It also contains a hygromycin resistance gene for future experiments involving clone selection.

Preparation of formulations

Liposomal complexes were prepared by adsorption of DNA onto blank liposomes at +4 /-1 charge ratio. The charge ratio refers to the positive charges of the cationic lipid DOTAP and the negative charges of the phosphate groups of nucleic

acids and DSPE-PEG phospholipid. A schematic representation of the preparation method was depicted in Figure 4.1.

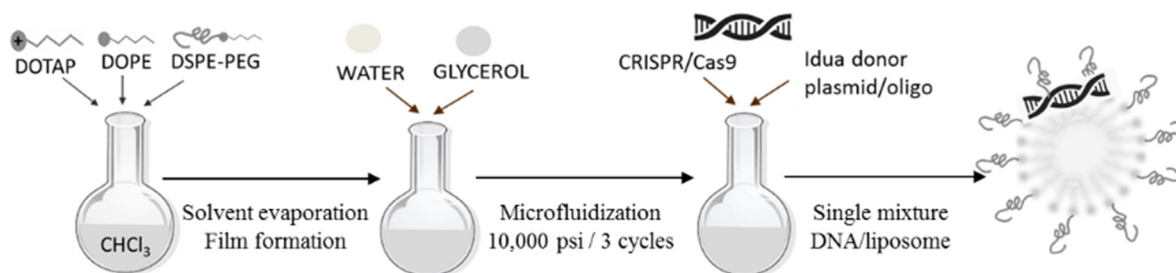


Figure 4.1. Schematic representation of the preparation of liposome/DNA complexes by adsorption of DNA onto liposomes.

Blank liposomes were composed of 0.56% (w/w) phospholipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) (Lipoid, Germany), 0.56% (w/w) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane (DOTAP) (Lipoid, Germany), and 0.285% (w/w) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N- [amino (polyethylene glycol)- 2000] (DSPE-PEG) (Lipoid, Germany). Lipids were dissolved in chloroform and evaporated under reduced pressure (40°C). The thin lipid film was hydrated in an aqueous glycerol solution (2.25% (w/w), Merck, Brazil), vortexed for 1 min and left to stand overnight at 4°C. On the following day, formulations were sonicated for 10 min at 38°C. Formulations were passed through a microfluidizer (Microfluidics, CAN) at 10,000 psi for 3 cycles.

Complexes were prepared by the adsorption of DNA on blank formulations. DNA adsorption was performed by adding previously established amounts of DNA to blank liposomes at room temperature for 30 min, resulting in L/CRISPR+*Idua*, when CRISPR/Cas9 aiming at ROSA26 locus and *Idua* donor were associated; and L/CRISPR+IDUA complexes when CRISPR/Cas9 aiming at Trp402* and Trp402* donor oligonucleotide were associated to the liposomes.

Fluorescent liposome for *in vivo* experiments

The NBD-PE (N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine, Triethylammonium Salt) fluorescent labeled phospholipid (Thermo Fisher Scientific, USA) was dissolved in chloroform with the other lipids in the proportion of 1 mg/mL of formulation replacing the same amount of DOPE. The preparation of the formulation continued as described to the blank liposome and adsorption of CRISPR+Idua plasmids producing fluorescent L/CRISPR+Idua complexes, referred as “fluorescent liposome complexes”.

Droplet size and zeta potential

The mean droplet size, polydispersity index and ζ -potential of the formulations and complexes were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) at 90° and electrophoretic mobility measurements (3000HS Zetasizer, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The samples were diluted in water or 1 mM NaCl.

***In vitro* experiments**

Cells used in the experiments were from primary fibroblast culture obtained from human skin biopsy. The cells were obtained from young MPS I patients with Hurler syndrome (genotype Trp402*/Trp402*) and normal subjects under informed consent. The project was approved by the local ethics committee (CEUA/HCPA #150416). Fibroblasts were cultivated in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, USA) supplemented with 10% FBS (Fetal bovine serum, Gibco, USA) and 1% ampicillin / streptomycin. The cells were grown to 70% – 80% confluence, and incubated in a humidified CO₂ incubator at 37°C.

Cell viability assay

Cell viability was assessed in MPS I fibroblasts using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, USB Corporation, USA) assay, performed after incubation with blank liposomes or L/CRISPR+IDUA complexes. Cells were cultivated in DMEM containing 10% FBS, and 1% ampicillin / streptomycin, and seeded at 1×10^4 cells/ well in a 96-well plate. Increasing volumes (0, 2.82, 5.64, 11.35,

22.6, 45, and 90 μL) of the blank formulations or complexes (which contained 0, 1, 2, 4, 7.5, 15, and 30 μg of adsorbed DNA) were incubated with the fibroblasts cultivated in DMEM for 48 h. Then, the medium was removed and a 5 g/L MTT solution was added. Cells were incubated at 37°C with 5% CO_2 for 4 h. After that, 100 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO, Synth Solutions, BRA) were added to dissolve the blue formazan crystals. The optical density was measured at 570 nm using a spectrophotometer (SpectraMax M2, Molecular Devices, USA). Cells incubated in DMEM were used as control for 100% cellular viability, while 0% of cellular viability was obtained after incubation of cells with Triton X-100 (2%, w/v) (Sigma-Aldrich, USA).

Gene transfer

MPS I fibroblasts at passages 2 - 6 were seeded at 5×10^4 cells/well in a 6-well plate, cultivated in DMEM containing 10% FBS, and 1% ampicillin/streptomycin and maintained in a humidified CO_2 incubator at 37 °C for 24 h before the assay. The cells were grown to 50 – 60% confluence and gene transfer was performed by incubating the cells with 60 μL of L/CRISPR+IDUA complexes containing 10 μg of each DNA sequence for 24 h in serum-free DMEM, then 10% FBS was added and cells were incubated up to 48 h.

The donor sequence alone (Naked IDUA), the plasmid containing the sequences encoding for the CRISPR-Cas9 elements alone (Naked CRISPR), the two together (Naked CRISPR+IDUA), and the two together complexed with Lipofectamine 3000™ (according to the manufacturer's instructions) were incubated in the same conditions and used as additional controls for IDUA activity.

IDUA activity

At 2, 15 or 30 days after transfection, an aliquot of DMEM was removed, and fibroblasts were harvested with trypsin, centrifuged, and suspended in purified water. After vortex, cells were centrifuged and the supernatant was used to assess IDUA activity. IDUA activity was performed using 4-methylumbelliferyl alpha-L-iduronide (Glycosynth, UK) as a substrate. Cell lysate and DMEM were incubated at 37°C for 1 h in sodium formate buffer (pH 2.8) [24,25]. Fluorescence was measured with 365 nm excitation and 450 nm emission filters in a fluorescence spectrophotometer

(SpectraMax M2, Molecular Devices, USA). Results were calculated in nmol/h/mL of DMEM or nmol/h/mg protein in fibroblasts and shown as a percentage of IDUA activity measured in normal fibroblasts. The protein content was quantified using the method described by Lowry and coworkers [26].

CytoPainter LysoDeep™ Red Indicator labeling

Since cells with lysosomal storage present an increase in lysosome number and size, we used a lysosomal dye as a marker of lysosomal content. The cultivated cells were transferred to cover slips inside a culture plate filled with DMEM supplemented with 10 % FBS culture medium. At 2, 15 and 30 days after transfection treated fibroblasts, MPS I untreated fibroblasts, and normal fibroblasts were labeled with the fluorogenic probe CytoPainter LysoDeep™ Red Indicator Reagent (ab176829, Abcam, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated with dye for 30 minutes at 37 °C and then washed in Hank's Balanced Salt Solution with 20 mM HEPES buffer (HBBS). Half of the cells were analyzed for fluorescence intensity by flow cytometry and other half was fixed in 4% paraformaldehyde and analyzed under a Leica TCS SP8 MP confocal laser microscope (Leica Microsystems, USA).

Confocal microscopy

After 30 min of incubation at 37 °C with CytoPainter LysoDeep® Red Indicator, cells on coverslips were fixed in 4 % paraformaldehyde for 15 minutes, and mounted with Fluoroshield® mounting medium with DAPI (Abcam, USA). Images were acquired in fluorescence (Ex/Em = 596/619 nm) and transmission channels with a 63x glycerin-immersion objective in a Leica TCS SP8 MP confocal laser microscope (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, USA).

Flow cytometry

After incubation with the CytoPainter LysoDeep™ Red Indicator, live cells were resuspended in HBBS buffer and analyzed for fluorescence intensity levels by Invitrogen Attune™ NXT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific, USA). First, an FSC/SSC gate was delineated to define a live gate analysis. Fluorescence intensity from samples was then compared by histogram analysis. The first comparison was

between MPS I and normal fibroblasts (n=5). Then the three treated groups (2, 15, and 30 days) were compared to MPS I untreated group (n=5). For each sample, 10,000 events were acquired.

***In vivo* experiments**

Animal model

Newborn MPS I C57BL/6 mice (2-3 days old) (*Idua*-KO, kindly donated by Dr. Elizabeth Neufeld, UCLA, USA) (n= 8; n=4 for each treatment) were used for the experiments. MPS I mice were genotyped by PCR reaction as previously described [24] and maintained under standard conditions.

The treatments consisted in one hydrodynamic injection (10% of body weight) of L/CRISPR+*Idua* complexes (called only “Liposome” group for *in vivo* experiments) or Naked CRISPR+*Idua* plasmids (called “Naked” group for *in vivo* experiments) in the superficial temporal vein of newborn mice [27].

Monthly after treatment, blood was collected and serum *Idua* activity was determined. After six months, mice were anesthetized with isoflurane prior to cervical dislocation, and perfused through the portal vein with a solution containing at least 20 mL of 0.9% NaCl for 3 min to eliminate blood. Brain, lung, heart, liver, spleen, and kidney tissues were removed and flash frozen in liquid nitrogen for biochemical analyzes or collected in 10% buffered formalin for histological analyzes. Two control groups were used, untreated MPS I mice and normal six-month old mice (age of all the animals at the time of euthanasia) (n= 6/group).

Biodistribution of fluorescent complexes after hydrodynamic injection

One experimental group of newborn MPS I mice (n=3) received one hydrodynamic injection of fluorescent liposome complexes in the superficial temporal vein. One minute after treatment, mice were euthanized by decapitation by guillotine with a sharp blade. Blood was collected in EDTA. Brain, lung, heart, liver, spleen, and kidney tissues were removed and mounted on a metal sample holder using Tissue-tec O.C.T™ (Sakura Fine Technical, JPN). Then, the block was flash frozen in liquid

nitrogen and stored at -20°C, and cut in 40 µm thick slices with a cryostat (Leica CM 1850, JPN). The slices were mounted on a microscope slide and analyzed under a fluorescence microscope (Olympus BX51TF, JPN). The images were taken at 100x for overview images, or 400x for closer images.

Flow cytometry

After administration of the fluorescent labeled complexes, blood collected with EDTA was diluted in HHBS buffer and analyzed for fluorescence intensity levels by Invitrogen Attune™ NXT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific, USA). First, an FSC/SSC gate was delineated to define a live gate analysis. Fluorescence intensity from samples was then compared by histogram analysis. The comparison was between treated MPS I and untreated MPS I groups (n=3). For each sample, 50,000 events were acquired.

IDUA activity

About 30 mg of tissue was homogenized in distilled water and the fluorimetric assay was performed [25] to evaluate IDUA activity. The results were expressed as nmol/h/mg protein. Results were normalized by protein quantity and expressed as percentage of normal mice. The protein content was measured using the method of Lowry [28].

GAGs levels

Frozen tissues were homogenized in 0.5 mL phosphate buffer 50 mM pH 6.5 with 0.24 g/L L-cysteine and 0.4% EDTA 0.5 M, incubated for 2 h at 60°C, mixed with 150 µL chloroform and centrifuged for 15 minutes at 10,000G at 4°C. GAGs were measured using the dimethyl blue (DMB) technique, in which 25 µL of supernatant was mixed with freshly prepared DMB solution (DMB 0.3 mol/L with 2 mol/L Tris) and absorbance was read at 530 nm. Results were normalized by protein quantity and expressed as percentage of normal mice. Urine samples were centrifuged and 25 µL were used for measuring GAGs levels. Results were normalized with creatinine, which was measured using the picric acid method [24].

Histological analyzes

The tissues were fixed with 10% buffered formalin, embedded in paraffin and submitted to semi-thin sections for the assembly of the histological slides. Hematoxylin-eosin (H&E) and Alcian-blue staining were used to investigate GAGs accumulation. The slides were analyzed under a microscope (Olympus BX51TF, JPN) (200x for overview images, or 400x for closer images).

Ethics statement and statistics

This study was approved by the authors' institutional ethics review board (permit number #15-0416) and all experiments with animals were monitored by a veterinarian.

IBM SPSS Statistics version 20 (IBM, USA) was used for statistical analysis. Possible gender effects were analyzed in all tests, and no significant differences were found between males and females. Results were compared using ANOVA and Tukey or Kruskal-Wallis and Mann-Whitney, or Student's T test, as indicated. P values lower than 0.05 were considered statistically significant, considering *** $p < 0.0005$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$. GraphPad Prism 5 (GraphPad, USA) software was used to graphic design.

RESULTS

Physicochemical properties of the formulations

The physicochemical properties of the formulations are listed in Table 4.1. Mean droplet size of blank formulation L was around 80 nm.

However, mean diameter tended to increase and polydispersity index tended to decrease after complexation with DNA. Blank formulation L showed a positive ζ -potential of about +40 mV, which significantly decreased (up to approximately +25 mV) when DNA was added to formulations (Student's t-test, $p < 0.05$).

Table 4.1. Physicochemical properties of formulations.

Formulation	Mean diameter (nm)	P.I.	ζ-potential (mV)
Blank Liposome	80.9 ± 4.5	0.35 ± 0.06	+38.3 ± 1.4
L/CRISPR+IDUA	98.5 ± 6.5 ^a	0.19 ± 0.07	+25.1 ± 1.2 ^b
L/CRISPR+Idua	102.3 ± 3.8 ^a	0.15 ± 0.11	+28.5 ± 1.5 ^b
Fluorescent Liposome	112.2 ± 5.9 ^a	0.18 ± 0.05	+24.3 ± 2.1 ^b

Results represent the mean ± standard deviation of three experiments; difference before and after complexation. Student's t-test, $p < 0.05$. ^a Mean diameter. ^b ζ-Potential. L/CRISPR+IDUA: liposome associated with CRISPR/Cas9 plasmid and Trp402* *IDUA* donor oligonucleotide for *in vitro* correction of human fibroblasts; L/CRISPR+Idua: liposome associated with CRISPR/Cas9 plasmid and *Idua* donor plasmid for *in vivo* mouse correction; Fluorescent Liposome: liposome produced with fluorescent lipid NBD-PE associated with CRISPR/Cas9 plasmid and *Idua* donor plasmid.

***In vitro* experiments**

IDUA activity

Firstly, the cell viability assay demonstrated that the administration of 60 μL of both blank liposome and L/CRISPR+IDUA liposome complexes led to low levels of cell death (25% and 20% respectively, Supplementary Figure 4.3). The two treatments did not show statistical difference ($p > 0.05$), and these results demonstrated that at the volume of 60 μL the cells showed high viability and complexes were used for the subsequent experiments. Thus, MPS I fibroblasts were transfected with liposome complexes and IDUA activity was measured after the incubation. Untreated MPS I cells produced undetectable levels of IDUA, also observed for cells incubated with Naked IDUA, Naked CRISPR, and Naked CRISPR+IDUA, whose results were not different from MPS I (Supplementary Figure 4.4A and 4.4C).

Enzyme activity after treatment was significantly maintained for up to 30 days both within the fibroblasts as well as in DMEM, reaching an average of 4% of IDUA activity found in normal fibroblasts. These results were similar to those obtained with Lipofectamine 3000™ (Supplementary figure 4.4B and 4.4D). These findings show that the enzyme was being produced and secreted to the extracellular medium (Figure 4.2). Based on these results we performed the other assays *in vitro* only with the L/CRISPR+IDUA liposome complexes.

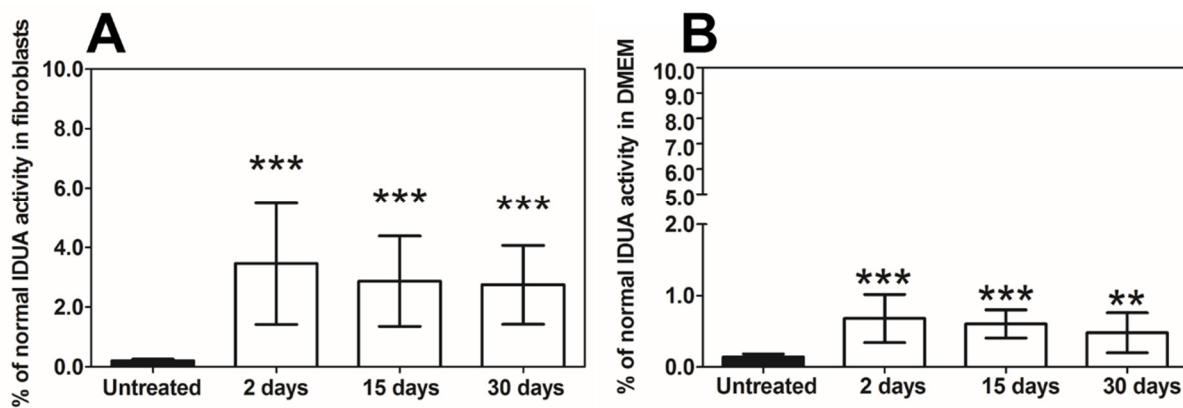


Figure 4.2. Enzyme activity after gene editing *in vitro*: IDUA activity in human fibroblasts and in supernatant (secreted IDUA). **(A)** IDUA activity (considering results from a normal fibroblast as 100%; 70-100 nmol/h/mg protein) *versus* time of culture. Untreated MPS I fibroblasts (black bar), MPS I fibroblasts treated with L/CRISPR+IDUA cultured for 2, 15, or 30 days (white bars). **(B)** Percentage of IDUA activity found in DMEM of normal fibroblasts *versus* time of culture measured in supernatant. Untreated MPS I fibroblasts (black bar), MPS I fibroblasts treated with L/CRISPR+IDUA cultured for 2, 15, and 30 days (white bars). Results represent the mean \pm standard error of the mean of ten experiments; *** $p < 0.0005$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$, compared to untreated MPS I fibroblasts (one-way Anova, Kruskal-Wallis test followed by Dunns post hoc). L/CRISPR+IDUA: liposome associated with CRISPR/Cas9 plasmid and Trp402* IDUA donor oligonucleotide for *in vitro* correction of human fibroblasts.

Lysosomal storage

In order to determine if gene editing was able to decrease lysosomal storage, lysosomal size and number were evaluated by confocal microscopy and flow cytometry. The fibroblasts were stained with LysoDeep™ and Fluoroshield™ with DAPI stains and the images were analyzed under a confocal microscope (Figure 4.3). Untreated MPS I fibroblasts were used as negative control, and normal fibroblasts were positive control (Figure 4.3A). When L/CRISPR+IDUA complexes were added to the cell cultures, a decrease in the red stained area could be observed at any time of culture, and it is lightly colored in comparison with untreated MPS I fibroblasts. The fibroblasts were also analyzed by flow cytometry (Figure 4.3B). Untreated MPS I fibroblasts were used as negative control, and normal fibroblasts were positive control. It was possible to observe a reduction in the fluorescence of lysosomes after 2, 15, and 30 days of culture after treatment. After 30 days of culture the fibroblasts treated with L/CRISPR+IDUA presented the same fluorescence intensity of normal fibroblasts ($p < 0.05$).

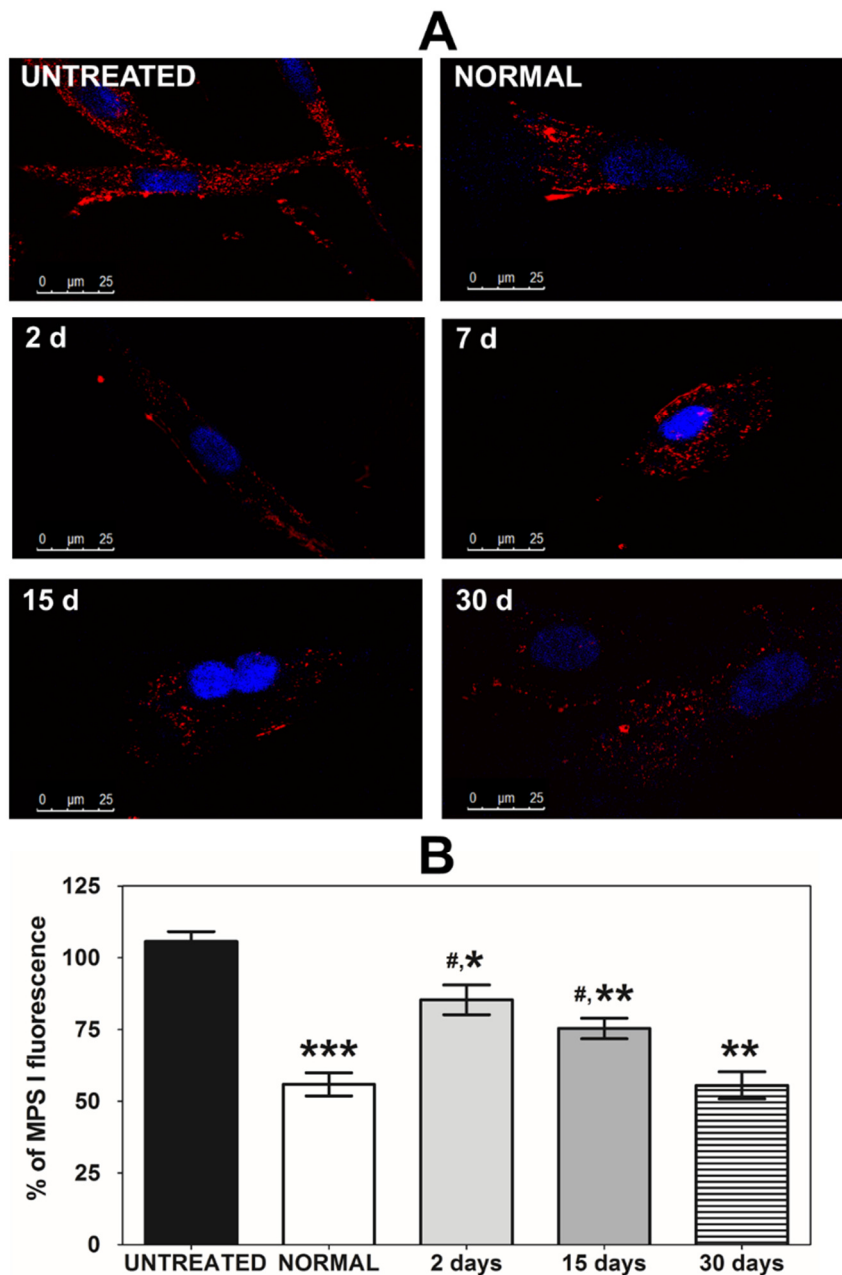


Figure 4.3. Correction of lysosomal abnormalities after treatment *in vitro*. Fibroblasts were labeled with LysoDeep™ and DAPI™; images were acquired in fluorescence (Ex/Em = 596/619 nm) and transmission channels with a 63x glycerin-immersion objective in a Leica Microsystems confocal microscope. **(A)** Confocal microscopy images of MPS I fibroblasts, normal fibroblasts, and MPS I fibroblasts 2, 15, and 30 days after L/CRISPR+IDUA treatment. Scale bars, 25 μm ; magnification, 630x. **(B)** Representative graph of lysosome dyed live cells analyzed for fluorescence intensity levels in flow cytometry. The normal and treated groups were compared to MPS I untreated group. Values refer to average of the percentage of cells in each gate of 5 independent experiments \pm standard deviation. *** $p < 0.0005$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$, compared with MPS I cells and # $p < 0.05$ compared with normal cells (one-way ANOVA, followed by Tukey's test). L/CRISPR+IDUA: liposome associated with CRISPR/Cas9 plasmid and Trp402* *IDUA* donor oligonucleotide for *in vitro* correction of human fibroblasts.

***In vivo* experiments**

Biodistribution of fluorescent liposome complexes

The biodistribution of the fluorescent liposome complexes in neonatal MPS I mice after one hydrodynamic injection in the superficial temporal vein was analyzed. The images can be seen in Figure 4.4, and they clearly demonstrated that lung, heart, and liver tissues retained more complexes than the other organs. Flow cytometry was performed in blood and we found 28% of fluorescent cells in comparison to untreated MPS I mice, which presented less than 1%.

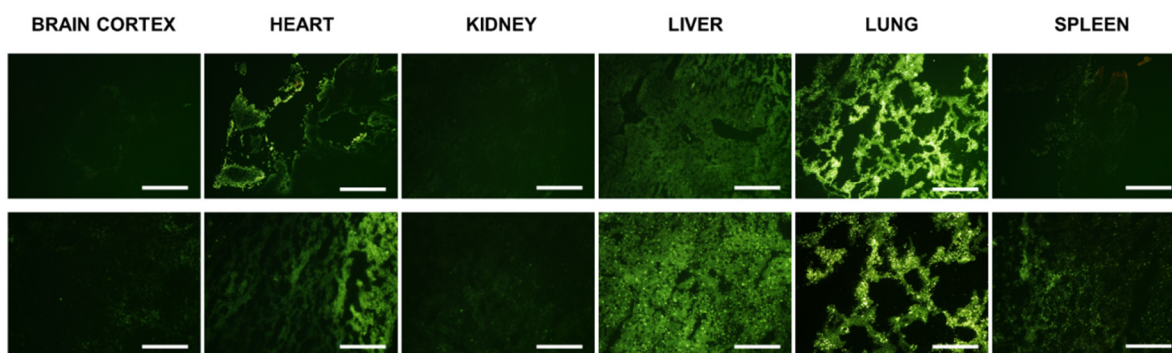


Figure 4.4. Biodistribution of fluorescent liposome complexes after injection. The biodistribution of fluorescent L/CRISPR+Idua complexes in newborn MPS I mice after one hydrodynamic injection in the superficial temporal vein was analyzed under a fluorescence microscope. Images were acquired in fluorescence (Ex/Em = 596/619 nm) at 200x (top images, scale bars 100 μ m) and 400x (down images, scale bars 500 μ m) of magnification respectively, and are representative of three experiments. Fluorescent L/CRISPR+Idua: liposome produced with the fluorescent lipid NBD-PE associated with CRISPR/Cas9 plasmid and ROSA26 *Idua* donor plasmid. Untreated MPS I mice had no detectable fluorescence in any organs in the set conditions of microscopy.

Idua activity and GAGs measurement

Mice serum collected monthly after the hydrodynamic injection showed a significant increase in *Idua* activity, which reached a constant average of 6% of enzyme activity found in a normal mouse after liposome treatment and about 1.5% after Naked injection, versus undetectable activity in untreated mice (Figure 4.5A). The analysis of *Idua* activity in mice organs at 6 months after the hydrodynamic injection of liposome

complexes showed statistical increase in the heart (12% of normal levels), lung (9%), liver (3%), kidney (2%), and spleen (0.75%) but not in the brain (Figure 4.6A).

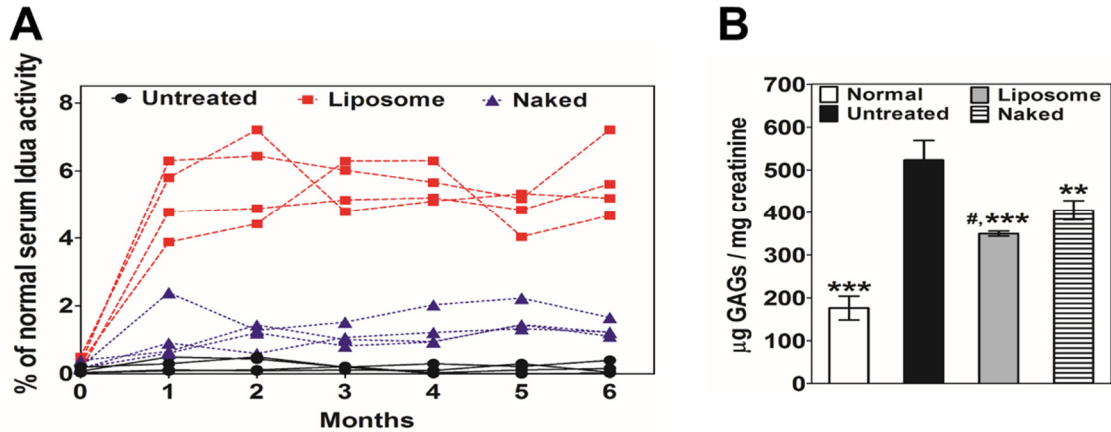


Figure 4.5. Results of neonatal *in vivo* gene editing. The efficacy of the treatments was demonstrated by Idua activity and GAGs levels after injection of L/CRISPR+Idua or Naked DNA complexes. **(A)** IDUA activity in mouse serum measured monthly (shown as percentage of normal activity). Untreated MPS I mice (black circles, MPS I), MPS I mice treated with L/CRISPR+Idua complex (red squares, Liposome), MPS I mice treated with naked CRISPR+Idua plasmids (blue triangles, Naked). **(B)** Urinary GAGs levels at 6 months expressed as μg of GAGs/ mg of creatinine. Results represent the mean \pm standard deviation of at least four experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, compared to untreated MPS I mice at the same age, and # $p < 0.05$ (one-way Anova and Tukey) compared to Naked group. L/CRISPR+Idua: liposome associated with CRISPR/Cas9 plasmid and ROSA26 *Idua* donor plasmid for *in vivo* mouse correction. Naked CRISPR+Idua: naked injection of CRISPR/Cas9 plasmid and ROSA26 *Idua* donor plasmid in 0.9% NaCl for *in vivo* mouse correction.

When comparing with the results of treated mice with the naked DNA, one can affirm that this group achieved higher activities in the liver (5% of normal), kidney (3%), and spleen (1%) (Figure 4.6A). Thus, the liposomal complex achieved significantly better results in lung and heart, while the naked plasmids injection better transfected the liver. Despite low enzyme levels, it was sufficient to significantly reduce urinary GAGs levels (Figure 4.5B) and GAGs content in the lung, heart, kidney, and spleen (figure 4.6B), although the liposome showed to be more effective in reducing urinary, lung, and heart levels while naked plasmids were more efficient in lowering liver GAGs content.

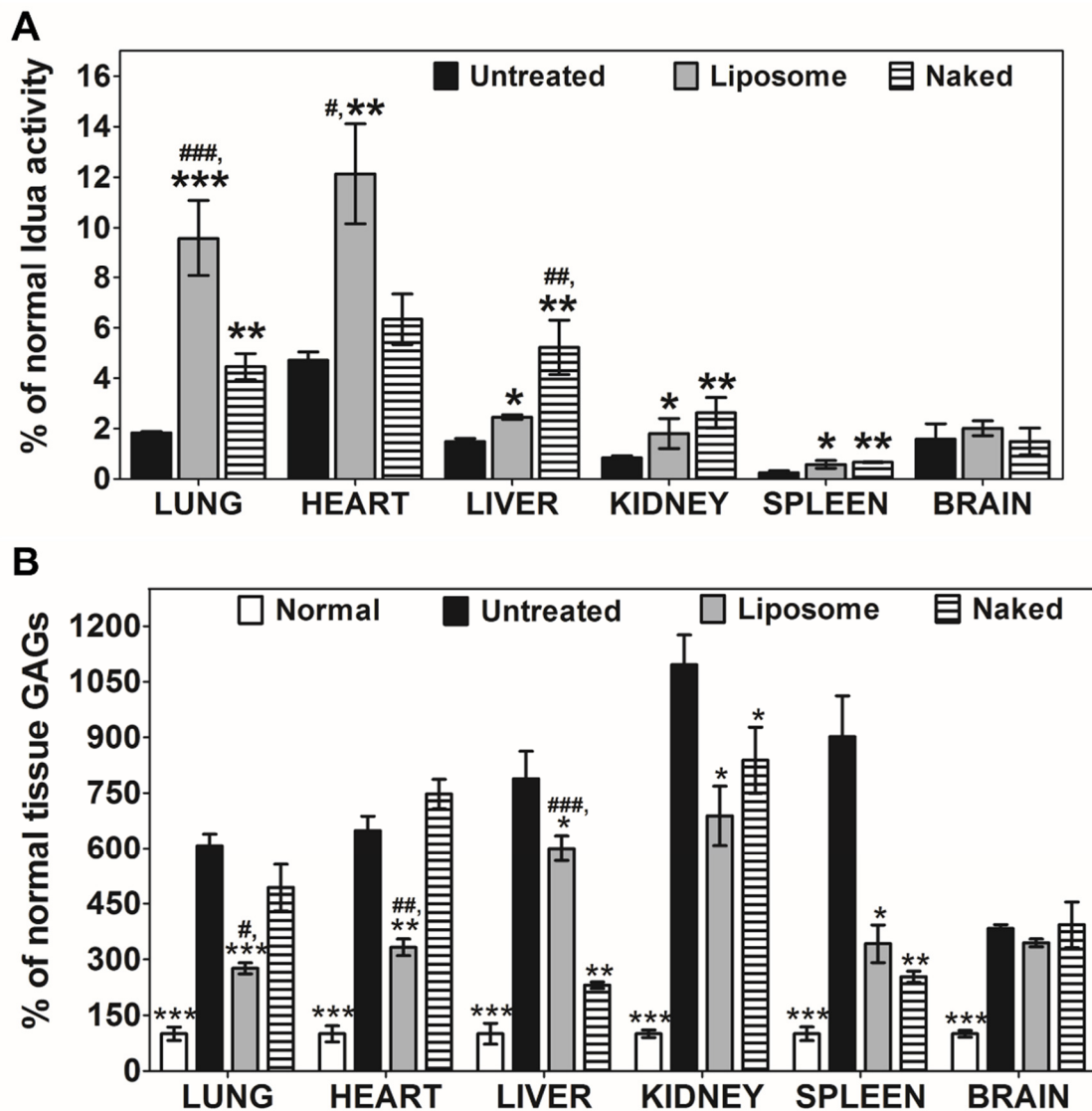


Figure 4.6. Results of neonatal *in vivo* gene editing. The efficacy of the treatments was demonstrated by *Idua* activity and GAGs levels after injection of L/CRISPR+*Idua* or Naked DNA complexes. **(A)** IDUA activity in different tissues at 6 months (shown as percentage of normal activity). **(B)** GAGs levels, expressed as μg of GAGs/ mg of protein. Untreated MPS I mice (black bars, MPS I), MPS I mice treated with L/CRISPR+*Idua* complex (grey bars, Liposome), MPS I mice treated with naked CRISPR+*Idua* plasmids (striped bars, Naked) and normal mice (white bars, Normal). Results represent the mean \pm standard deviation of at least four experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, compared to untreated MPS I mice at the same age, and # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$, ### $p < 0.0005$ (one-way Anova and Tukey) compared to the other treated group. L/CRISPR+*Idua*: liposome associated with CRISPR/Cas9 plasmid and ROSA26 *Idua* donor plasmid for *in vivo* mouse correction. Naked CRISPR+*Idua*: naked injection of CRISPR/Cas9 plasmid and ROSA26 *Idua* donor plasmid in 0.9% NaCl for *in vivo* mouse correction.

Tissue GAGs storage

Finally, the potential to reduce GAGs accumulation was evaluated in dissected organs, such as heart, kidneys, liver and lungs, 6 months post administration of L/CRISPR+Idua complex or Naked CRISPR+Idua plasmids (Figure 4.7). All the MPS I organs demonstrated expansion of tissue layers by clear cells containing GAGs accumulation, which are Alcian blue positive (Figure 4.7, arrows). In agreement with quantification of GAGs levels, both Naked and liposome-treated mice presented reduction in the ballooned cells in all organs, but some discreet storage could still be observed. Tissue sections of major organs showed no presence of necrosis or inflammatory infiltrate, suggesting no obvious tissue toxicity by the two treatments. The spleen is not shown because it is very difficult to observe differences between the groups, as spleen cells are overlapped.

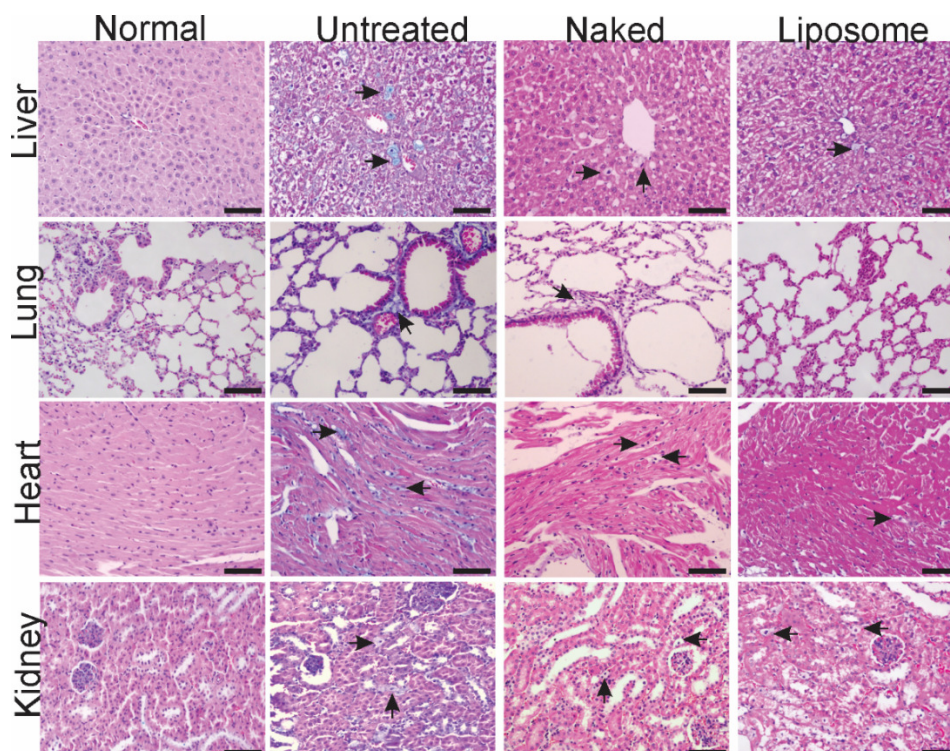


Figure 4.7. Representative histological sections stained with Hematoxylin-eosin and Alcian blue stains of different organs from a normal, a six-month old untreated MPS I mouse, a Naked CRISPR+Idua-treated MPS I mouse, and a L/CRISPR+Idua-treated MPS I mouse. Cellular deposition of GAGs (Alcian blue positive material) within vacuolated clear cells are seen (arrows as examples) in MPS I mice and are markedly reduced in treated animals. Scale bar (200x), 100 μ m. L/CRISPR+Idua: liposome associated with CRISPR/Cas9 plasmid and ROSA26 *Idua* donor plasmid for *in vivo* mouse correction. Naked CRISPR+Idua: naked injection of CRISPR/Cas9 plasmid and ROSA26 *Idua* donor plasmid in 0.9% NaCl for *in vivo* mouse correction.

DISCUSSION

In this study we evaluated the potential to perform MPS I gene therapy by *in vitro* transfection of fibroblasts from MPS I patients, and direct *in vivo* hydrodynamic injection of a liposomal carrier associated with the CRISPR/Cas9 system in the MPS I murine model.

Firstly, we assessed the physicochemical properties of the liposomal complexes. They presented small monodisperse droplets (around 100 nm) even when associated with DNA. This could be related to the stability provided by the microfluidization procedure that homogenizes droplets by high pressure shear, and also due to the presence of DSPE-PEG in the formulations, which stabilizes droplets and may prevent their aggregation [29,30]. ζ -potential showed positive values that are related to the excess of cationic lipid DOTAP, which is required for the proper association with negatively charged nucleic acids and interaction with cell membranes [31]. The complexes also presented low cytotoxicity.

The transfection of MPS I fibroblasts partially restored IDUA activity in these cells. This was maintained for up to 30 days, suggesting that our sequences were indeed able to integrate in the cell's genome. To evaluate if this increase led to cell phenotype similar to normal, confocal microscopy and flow cytometry were performed to visualize potential improvements in the lysosomal mass. GAGs accumulation in homozygous Trp402* cells is associated with a superabundance of lysosomes, which is a marker of most LSD [32]. The treatment was capable to reduce the fluorescence intensity attributed to the lysosomes when compared to MPS I untreated fibroblasts. These results, confirmed by flow cytometry, suggested that the treatment could progressively reduce the expanded lysosomal area due to the excessive GAGs storage [33]. The results from flow cytometry confirmed the reduction in the mass of lysosomes to normal levels. Since not all cells were edited, these findings evidence the phenomenon of cross-correction [34–36], which is the ability of enzyme-expressing cells to correct neighboring cells that are enzyme-deficient. This effect is possible because approximately 10% of the lysosomal enzymes will be secreted from cells to the extracellular environment, and our results *in vitro* have also shown that the enzyme produced is being secreted. Then, the enzyme is taken up by the neighboring cells probably via M6P receptors, through receptor-mediated endocytosis. Thus, for an

effective therapy, only a relatively small number of cells expressing IDUA is required to correct many other cells that are unable to produce the enzyme [37].

The next step was assessing the ability of the liposomal complex L/CRISPR+Idua to transfect cells *in vivo*, more specifically in newborn MPS I mice. We chose to insert the whole mouse *Idua* cDNA because of the nature of the mouse knockout, and because the approach of inserting our gene into a “safe harbor” would imply in a more feasible approach in a clinical setting. The biodistribution of fluorescent-labeled complexes after hydrodynamic injection demonstrated that the liposomal carriers showed an enhanced affinity primarily to lungs, then heart, and finally to liver also demonstrating ability to penetrate blood cells. The results obtained from *Idua* activity, GAGs measurement, and representative histology 6 months after treatment corroborate the findings of fluorescent-labeled liposome complex biodistribution.

The preferential distribution of the liposomal complex to lungs was not expected. The rapid injection of a large volume of liposome/DNA complexes into a vein induces immediate congestion of the heart, and then complexes reflux into the liver via the hepatic vein, pushing the blood backward towards the portal vein, thereby avoiding immediate mixing of DNA with nucleases from blood. Once in the liver, the pressurized solution enlarges the liver fenestrae, and forces the permeability of the plasma membrane to allow DNA to enter the cells [38]. In fact, gene transfer into cells in organs other than the liver are not completely elucidated as there’s evidence that the hydrodynamic delivery is applicable not only to fenestrated but also continuous capillaries [39]. Although this delivery method may not be extrapolated to human clinic yet, feasibility to perform the hydrodynamic procedure in large animals has been demonstrated using an image-guided hydrodynamic procedure using a computer controlled injection device [40,41].

It is known therefore that hydrodynamic delivery is an effective nonviral method of liver-targeted gene delivery [27]. However, in this study we demonstrated that it really depends on the vehicle used for transfection, as naked plasmids may be promptly directed to the liver [42,43], as shown, although our liposomal carrier demonstrated greater affinity to lungs and heart. Previous studies demonstrated immediate lung accumulation after intravenous injection of cationic liposomes and their DNA complexes [39,44,45]. Some studies have previously speculated that the

increased IDUA activity in the lungs after intravenous administration of lipid complexes may result from a possible lung embolization due to the cationic charge, and capture by the fenestrated capillaries of the pulmonary alveoli [13,14]. The uptake of liposomal complexes by lungs might be explained by the fact that this tissue is the first and largest capillary bed that the cationic complexes encountered following hydrodynamic administration, and the positively charged liposomes may perform electrostatic interactions with blood cells and form transient aggregates which may be temporally trapped in lung capillaries [46]. Our results suggest that these vectors could be used for pulmonary diseases, as cystic fibrosis or lung cancers, for example, although more studies are needed to study the efficacy of the system in these conditions.

Yin *et al.* reported a combined lipid nanoparticle–mediated delivery of Cas9 mRNA with adeno-associated viruses encoding a sgRNA and a repair template to induce gene repair in a mouse model of human tyrosinemia. Treatment generated fumarylacetoacetate hydrolase (Fah)-positive hepatocytes by correcting the causative Fah-splicing mutation, rescuing disease symptoms such as weight loss and liver damage. The efficiency of correction was >6% of hepatocytes after a single application, suggesting potential utility of Cas9-based therapeutic genome editing for a range of diseases [21]. In comparison, this study achieved similar levels of enzyme production in serum, with the particularity of using only a nonviral vector, which has many advantages over viral ones, making them more suitable for gene delivery [11].

Briefly, IDUA activity was correlated with GAGs measurements and histological analyzes, which demonstrated that the more enzyme production, the less GAGs accumulates. Urinary GAGs, a common biomarker used to monitor results of treatments, was also responsive to the gene therapy protocol, reducing its levels. However, GAGs levels in the brain were not reduced, probably due to low gene transfection in that organ allied to the fact that the lysosomal enzyme produced by peripheral organs does not cross the blood-brain-barrier, and therefore does not reach this tissue [11,47].

CONCLUSION

This study assessed the ability of liposomes as nonviral carriers of the CRISPR/Cas9 system, and Trp402* IDUA donor oligonucleotide in *in vitro* gene therapy or ROSA26 *Idua* donor for MPS I. The overall results showed that cationic liposomes led to increased IDUA activity and reduction in lysosomal mass in human fibroblasts bearing the most common mutation found in MPS I patients.

The last and more important results demonstrated that these complexes presented an unexpected biodistribution, as complexes were primarily detected in lungs, heart, and less in the liver. IDUA activity, GAGs measurements, and histological analyzes corroborated these results and demonstrated that liposomal CRISPR/Cas9 carriers effectively transfected mammalian cells and promoted long-lasting production of functional IDUA.

Finally, this set of results brings hope to the treatment of MPS I by gene editing with liposomes as nonviral carriers of the CRISPR/Cas9 system. Our future efforts will focus on different administration routes and formulations to increase enzyme activity in the organs and lead to a normalization of GAGs levels. We will also develop new strategies to reach other organs relevant for this disease, such as the brain.

Declaration of interest

The authors were supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant numbers 470888/2014-8 and 141742/2014-3) and FIPE/HCPA (grant number 1504-16). R.S.S. would like to thank CNPq for the scholarship. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

REFERENCES

- [1] R. Giugliani, Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries, *Genet. Mol. Biol.* 35 (2012) 924–931.
- [2] U. Matte, G. Yogalingam, D. Brooks, S. Leistner, I. Schwartz, L. Lima, D.Y. Norato, J.M. Brum, C. Beesley, B. Winchester, R. Giugliani, J.J. Hopwood, Identification and characterization of 13 new mutations in

mucopolysaccharidosis type I patients, *Mol. Genet. Metab.* 78 (2003) 37–43. doi:10.1016/S1096-7192(02)00200-7.

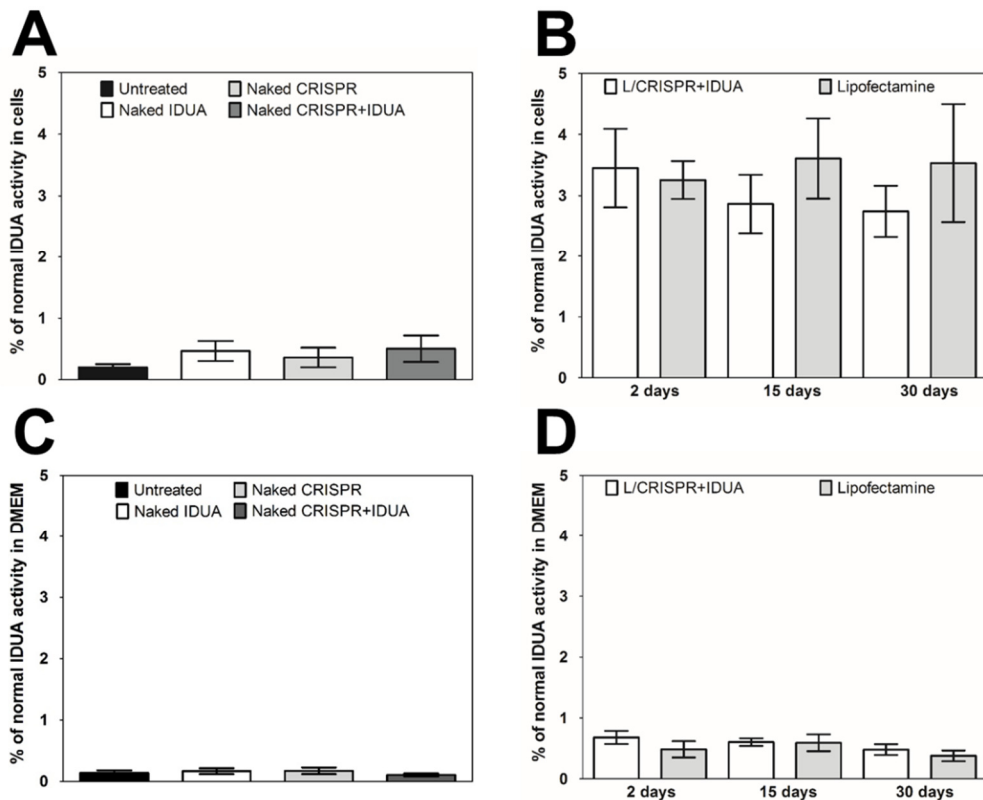
- [3] R. Giugliani, A. Federhen, M.V.M. Rojas, T. Vieira, O. Artigalás, L.L. Pinto, A.C. Azevedo, A. Acosta, C. Bonfim, C.M. Lourenço, C.A. Kim, D. Horovitz, D. Bonfim, D. Norato, D. Marinho, D. Palhares, E.S. Santos, E. Ribeiro, E. Valadares, F. Guarany, G.R. de Lucca, H. Pimentel, I.N. de Souza, J. Correa, J.C. Fraga, J.E. Goes, J.M. Cabral, J. Simionato, J. Llerena, L. Jardim, L. Giuliani, L.C.S. da Silva, M.L. Santos, M.A. Moreira, M. Kerstenetzky, M. Ribeiro, N. Ruas, P. Barrios, P. Aranda, R. Honjo, R. Boy, R. Costa, C. Souza, F.F. Alcantara, S.G.A. Avilla, S. Fagondes, A.M. Martins, Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment, *Genet. Mol. Biol.* 33 (2010) 589–604. doi:10.1590/S1415-47572010005000093.
- [4] C.E.M. Hollak, F.A. Wijburg, Treatment of lysosomal storage disorders: successes and challenges., *J. Inherit. Metab. Dis.* 37 (2014) 587–598. doi:10.1007/s10545-014-9718-3.
- [5] P. Patel, Y. Suzuki, A. Tanaka, H. Yabe, S. Kato, T. Shimada, R.W. Mason, K.E. Orii, T. Fukao, T. Orii, S. Tomatsu, Impact of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Therapy on Growth in Patients with Hunter Syndrome., *Mol. Genet. Metab. Reports.* 1 (2014) 184–196. doi:10.1016/j.ymgmr.2014.04.001.
- [6] M.M. Huang, A. Wong, X. Yu, E. Kakkis, D.B. Kohn, Retrovirus-mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase cDNA into human hematopoietic progenitor cells leads to correction in trans of Hurler fibroblasts., *Gene Ther.* 4 (1997) 1150–1159. doi:10.1038/sj.gt.3300504.
- [7] A.A. Lau, K.M. Hemsley, Adeno-associated viral gene therapy for mucopolysaccharidoses exhibiting neurodegeneration., *J. Mol. Med. (Berl)*. (2017). doi:10.1007/s00109-017-1562-0.
- [8] L. Ou, M.J. Przybilla, B.L. Koniar, C.B. Whitley, Elements of lentiviral vector design toward gene therapy for treating mucopolysaccharidosis I., *Mol. Genet. Metab. Reports.* 8 (2016) 87–93. doi:10.1016/j.ymgmr.2015.11.004.
- [9] M. Vance, T. Llanga, W. Bennett, K. Woodard, G. Murlidharan, N. Chungfat, A. Asokan, B. Gilger, J. Kurtzberg, R.J. Samulski, M.L. Hirsch, AAV Gene Therapy for MPS1-associated Corneal Blindness., *Sci. Rep.* 6 (2016) 22131. doi:10.1038/srep22131.
- [10] R. Penati, F. Fumagalli, V. Calbi, M.E. Bernardo, A. Aiuti, Gene therapy for lysosomal storage disorders: recent advances for metachromatic leukodystrophy and mucopolysaccharidosis I., *J. Inherit. Metab. Dis.* 40 (2017) 543–554. doi:10.1007/s10545-017-0052-4.
- [11] R. Schuh, G. Baldo, H. Teixeira, Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses, *Expert Opin. Drug Deliv.* 13 (2016) 1709–1718. doi:10.1080/17425247.2016.1202235.
- [12] M. Fraga, T.G. de Carvalho, D. da S. Diel, N.A. Kretzmann Filho, H.F. Teixeira,

- U. Matte, Cationic Nanoemulsions as a Gene Delivery System: Proof of Concept in the Mucopolysaccharidosis I Murine Model., *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15 (2015) 810–816.
- [13] M. Fraga, T.G. de Carvalho, J. Bidone, R.S. Schuh, U. Matte, H.F. Teixeira, Factors influencing transfection efficiency of pIDUA/nanoemulsion complexes in a mucopolysaccharidosis type I murine model., *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 2061–2067. doi:10.2147/IJN.S121558.
- [14] M. Fraga, F. Bruxel, D. Diel, T.G. de Carvalho, C.A. Perez, R. Magalhaes-Paniago, A. Malachias, M.C. Oliveira, U. Matte, H.F. Teixeira, PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model., *J. Control. Release.* 209 (2015) 37–46. doi:10.1016/j.jconrel.2015.04.013.
- [15] H. Kobayashi, D. Carbonaro, K. Pepper, D. Petersen, S. Ge, H. Jackson, H. Shimada, R. Moats, D.B. Kohn, Neonatal Gene Therapy of MPS I Mice by Intravenous Injection of a Lentiviral Vector, *Mol. Ther.* 11 (2017) 776–789. doi:10.1016/j.ymthe.2004.10.006.
- [16] H. Wang, H. Yang, C.S. Shivalila, M.M. Dawlaty, A.W. Cheng, F. Zhang, R. Jaenisch, One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering, *Cell.* 153 (2013) 910–918. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025.
- [17] P. Mali, L. Yang, K.M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J.E. DiCarlo, J.E. Norville, G.M. Church, RNA-guided human genome engineering via Cas9., *Science.* 339 (2013) 823–826. doi:10.1126/science.1232033.
- [18] L. Cong, F.A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P.D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L.A. Marraffini, F. Zhang, Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems., *Science.* 339 (2013) 819–823. doi:10.1126/science.1231143.
- [19] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity., *Science.* 337 (2012) 816–821. doi:10.1126/science.1225829.
- [20] H. Yin, W. Xue, S. Chen, R.L. Bogorad, E. Benedetti, M. Grompe, V. Koteliansky, P.A. Sharp, T. Jacks, D.G. Anderson, Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype., *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 551–553. doi:10.1038/nbt.2884.
- [21] H. Yin, C.-Q. Song, J.R. Dorkin, L.J. Zhu, Y. Li, Q. Wu, A. Park, J. Yang, S. Suresh, A. Bizhanova, A. Gupta, M.F. Bolukbasi, S. Walsh, R.L. Bogorad, G. Gao, Z. Weng, Y. Dong, V. Koteliansky, S.A. Wolfe, R. Langer, W. Xue, D.G. Anderson, Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo., *Nat. Biotechnol.* 34 (2016) 328–333. doi:10.1038/nbt.3471.
- [22] M. Morille, C. Passirani, A. Vonarbourg, A. Clavreul, J.-P. Benoit, Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer,

Biomaterials. 29 (2008) 3477–96.

- [23] W. Fujii, K. Kawasaki, K. Sugiura, K. Naito, Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease., *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) e187. doi:10.1093/nar/gkt772.
- [24] G. Baldo, F. Quoos Mayer, M. Burin, J. Carrillo-Farga, U. Matte, R. Giugliani, Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human mucopolysaccharidosis type I cells., *Cells. Tissues. Organs.* 195 (2012) 323–329. doi:10.1159/000327532.
- [25] J.J. Hopwood, V. Muller, A. Smithson, N. Baggett, A fluorometric assay using 4-methylumbelliferyl alpha-L-iduronide for the estimation of alpha-L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes., *Clin. Chim. Acta.* 92 (1979) 257–265.
- [26] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [27] S. Yan, Q. Fu, Y. Zhou, J. Wang, Y. Liu, X. Duan, S. Jia, J. Peng, B. Gao, J. Du, Q. Zhou, Y. Li, X. Wang, L. Zhan, High levels of gene expression in the hepatocytes of adult mice, neonatal mice and tree shrews via retro-orbital sinus hydrodynamic injections of naked plasmid DNA, *J. Control. Release.* 161 (2012) 763–771. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.05.018.
- [28] O.H. Lowry, N.. Rosebrough, F. Lewis, R.J. Randall, The folin by oliver, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.
- [29] B. Yu, R.J. Lee, L.J. Lee, Microfluidic Methods for Production of Liposomes, *Methods Enzymol.* 465 (2009) 129–141. doi:10.1016/S0076-6879(09)65007-2.
- [30] C.-L. Chan, R.N. Majzoub, R.S. Shirazi, K.K. Ewert, Y.-J. Chen, K.S. Liang, C.R. Safinya, Endosomal escape and transfection efficiency of PEGylated cationic liposome–DNA complexes prepared with an acid-labile PEG-lipid, *Biomaterials.* 33 (2012) 4928–4935. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.038.
- [31] S.E. McNeil, Y. Perrie, Gene delivery using cationic liposomes, *Expert Opin. Ther. Pat.* 16 (2006) 1371–1382. doi:10.1517/13543776.16.10.1371.
- [32] P. Bioulac, M. Mercier, C. Beylot, D. Fontan, The diagnosis of mucopolysaccharidoses by electron microscopy of skin biopsies., *J. Cutan. Pathol.* 2 (1975) 179–190.
- [33] K.M. Keeling, D.A. Brooks, J.J. Hopwood, P. Li, J.N. Thompson, D.M. Bedwell, Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation., *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 291–299.
- [34] E.L. Aronovich, P.B. Hackett, Lysosomal storage disease: Gene therapy on both sides of the blood–brain barrier, *Mol. Genet. Metab.* 114 (2016) 83–93. doi:10.1016/j.ymgme.2014.09.011.

- [35] J.C. Fratantoni, C.W. Hall, E.F. Neufeld, Hurler and Hunter Syndromes: Mutual Correction of the Defect in Cultured Fibroblasts, *Science* (80-). 162 (1968) 570 LP-572.
- [36] S.D. Hartung, R.G. Reddy, C.B. Whitley, R.S. McIvor, Enzymatic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts by adeno-associated virus-mediated transduction of the alpha-L-iduronidase gene., *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 2163–2172. doi:10.1089/10430349950017158.
- [37] R.O. Brady, C. Yang, Z. Zhuang, An innovative approach to the treatment of Gaucher disease and possibly other metabolic disorders of the brain, *J. Inherit. Metab. Dis.* 36 (2013) 451–454. doi:10.1007/s10545-012-9515-9.
- [38] B. Bonamassa, L. Hai, D. Liu, Hydrodynamic Gene Delivery and Its Applications in Pharmaceutical Research, *Pharm. Res.* 28 (2011) 694–701. doi:10.1007/s11095-010-0338-9.
- [39] G. Zhang, V. Budker, J.A. Wolff, High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA., *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 1735–1737. doi:10.1089/10430349950017734.
- [40] T. Suda, K. Suda, D. Liu, Computer-assisted hydrodynamic gene delivery., *Mol. Ther.* 16 (2008) 1098–1104. doi:10.1038/mt.2008.66.
- [41] T. Suda, D. Liu, Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications, *Mol. Ther.* 15 (2007) 2063–2069. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mt.6300314>.
- [42] M. Camassola, L.M. Braga, A. Delgado-Cañedo, T.P. Dalberto, U. Matte, M. Burin, R. Giugliani, N.B. Nardi, Nonviral in vivo gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2005) 1035–1043. doi:10.1007/s10545-005-0070-5.
- [43] E.L. Aronovich, B.C. Hall, J.B. Bell, R.S. McIvor, P.B. Hackett, Quantitative analysis of alpha-L-iduronidase expression in immunocompetent mice treated with the Sleeping Beauty transposon system., *PLoS One.* 8 (2013) e78161. doi:10.1371/journal.pone.0078161.
- [44] H. Ishiwata, N. Suzuki, S. Ando, H. Kikuchi, T. Kitagawa, Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes, *J. Control. Release.* 69 (2000) 139–148. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00293-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00293-5).
- [45] J.-S. Zhang, F. Liu, C.C. Conwell, Y. Tan, L. Huang, Mechanistic studies of sequential injection of cationic liposome and plasmid DNA, *Mol. Ther.* 13 (2006) 429–437. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.08.021>.
- [46] Z. Ma, J. Zhang, S. Alber, J. Dileo, Y. Negishi, D. Stolz, S. Watkins, L. Huang, B. Pitt, S. Li, Lipid-mediated delivery of oligonucleotide to pulmonary endothelium., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27 (2002) 151–159. doi:10.1165/ajrcmb.27.2.4653.
- [47] G. Baldo, R. Giugliani, U. Matte, Gene delivery strategies for the treatment of



Supplementary figure 4.4. Enzyme activity after gene editing *in vitro*: IDUA activity in human fibroblasts and in supernatant (secreted IDUA). (A) IDUA activity shown as percentage of activity found in normal fibroblasts or in (C) DMEM *versus* time of culture. Untreated MPS I fibroblasts (black bar), MPS I fibroblasts treated with naked IDUA oligonucleotide (white bar), MPS I fibroblasts treated with naked CRISPR plasmid (grey bar), and MPS I fibroblasts treated with naked CRISPR+IDUA plasmid and oligonucleotide (dark grey bar) cultured for 2 days. (B) IDUA activity shown as percentage of activity found in normal cells or in (D) DMEM *versus* time of culture. MPS I fibroblasts treated with L/CRISPR+IDUA (white bars), and MPS I fibroblasts treated with Lipofectamine 3000™ (grey bars) cultured for 2, 15, and 30 days. Results represent the mean \pm standard error of the mean of ten experiments; * $p < 0.05$, compared to untreated MPS I fibroblasts or Lipofectamine 3000™ (Student's T test). L/CRISPR+IDUA: liposome associated with CRISPR/Cas9 plasmid and Trp402* IDUA donor oligonucleotide for *in vitro* correction of human fibroblasts.

5.1. INTRODUÇÃO

Este quinto capítulo visa aprofundar a investigação dos efeitos da injeção hidrodinâmica dos complexos lipossomais na edição gênica dos camundongos MPS I. Em virtude dos resultados significativos de aumento da atividade enzimática e redução de GAGs em diversos tecidos, torna-se necessário avaliar se a correção gênica do modelo animal murino teria a capacidade de promover alterações morfológica nos órgãos e clínicas de alguns sintomas. Como os resultados foram promissores em órgãos como pulmão e coração, o funcionamento desses sistemas foi avaliado, e mais alguns outros tecidos, com base em estudos que indicam que algum tipo de melhora poderia ocorrer visto que houve aumento significativo da atividade enzimática sérica. Os resultados globais demonstraram que os animais tratados apresentaram fenótipo intermediário entre o normal e o MPS I, corroborado pela espessura intermediária do osso zigomático facial, enquanto o fêmur apresentou espessura similar a animais normais. Os animais tratados tiveram hipertrofia cardíaca em menor grau e a contratilidade dos ventrículos foi normalizada, exceto pela espessura das válvulas, que permaneceu similar ao modelo MPS I. A aorta, no entanto, teve redução no diâmetro com a contagem de quebras de elastina situada entre o normal e o não tratado. Foi evidente a melhora na resistência pulmonar, apesar do número de animais ainda ser pequeno e do estudo estar em andamento. O único órgão que não apresentou nenhuma melhora significativa foi o cérebro, com presença de neuroinflamação e demonstração da degeneração por testes comportamentais. Por fim, este capítulo demonstrou que os complexos são efetivos fisiologicamente e morfolologicamente in vivo, abrindo interessantes perspectivas para o tratamento da MPS I.

5.2. ARTIGO CIENTÍFICO

Neonatal nonviral gene editing with the CRISPR/Cas9 system improves cardiovascular, respiratory, and bone disease in mucopolysaccharidosis I mice

Estudo em andamento

NEONATAL NONVIRAL GENE EDITING WITH THE CRISPR/CAS9 SYSTEM IMPROVES CARDIOVASCULAR, RESPIRATORY, AND BONE DISEASE IN MUCOPOLYSACCHARIDOSIS I MICE

Roselena Silvestri Schuh^{1,3}, Esteban Alberto Gonzalez^{2,3}, Angela Maria Vicente Tavares³, Roberto Giugliani^{2,3}, Ursula Matte^{2,3}, Helder Ferreira Teixeira¹, Guilherme Baldo^{2,3,#}

¹*Centro de Terapia Gênica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, R. Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.*

²*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.*

³*Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, R. Sarmiento Leite, 500, 90035-190, Porto Alegre, RS, Brazil.*

⁴*Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.*

Corresponding author: Guilherme Baldo

E-mail: gbaldo@hcpa.edu.br

Telephone: +55 51 33598838

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a lysosomal disorder caused by the deficiency of alpha-L-iduronidase (IDUA), which promotes multisystemic storage of glycosaminoglycans (GAGs). Accumulation of dermatan and heparan sulfate in bone, cartilage, heart valves, lungs, and widespread tissues likely contributes to reduced mobility and increased morbidity in untreated MPS I individuals. We previously reported that neonatal hydrodynamic injection of liposomal CRISPR/Cas9 complexes expressing murine *Idua* resulted in long-lasting IDUA activity in lung and heart in MPS I mice, and secreted IDUA was taken up from blood by other organs, except for the brain. In the present study, we report the effect of this therapy on the cardiovascular, respiratory, bone, and brain disease. There were improvements in facial morphology and large bones, specifically in zygomatic and femoral width. The heart had reduced systolic and diastolic diameters, and left ventricle shortening fraction was similar to normal, although heart valves showed hyperplasia and lysosomal storage, and the thickness was not significantly different from untreated. In addition, liposome-treated MPS I mice had improved aortic diameter and elastin brakes, which were almost normalized. The respiratory function was evaluated and lung resistance showed a tendency to normalize. Nevertheless, the brain was not favored with improvements, as neuroinflammation was still present. Furthermore, these mice had just partial improvements in behavioral tests, suggesting some deterioration in brain function. We conclude that neonatal gene therapy can improve some aspects of bone and heart disease in MPS I mice. However, better delivery of IDUA to these and other “difficult-to-treat” tissues will be necessary to achieve more profound effects in bone, heart, and especially in brain.

Keywords: CRISPR; Gene therapy; Liposome; Lysosomal storage disease; Mucopolysaccharidosis type I; Nonviral vector.

INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive disease caused by the deficiency of the lysosomal enzyme alpha-L-iduronidase (IDUA, EC 3.2.1.76), which is involved in the catabolism of the glycosaminoglycans (GAGs) heparan and dermatan sulfate. Enzyme replacement therapy (ERT) and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) are the two treatments available for MPS I. However, these therapies are not completely effective, as ERT is not capable of crossing the blood–brain barrier (BBB) and reach the brain, joints, or bones, while HSCT shows to be mostly effective only until two years old [1–3].

MPS I clinical spectrum varies from the severe Hurler syndrome (OMIM #67014) to the attenuated Scheie syndrome (OMIM #67016), with intermediate disease phenotypes classified as Hurler–Scheie syndrome (OMIM#67015) [1,4]. Multisystemic manifestations as organomegaly, corneal clouding, heart and valve diseases, pulmonary hypertension, and joint stiffness are commonly present in all forms of MPS I, although Hurler patients may also present severe neurocognitive retardation [4–9]. Short and thick limbs and swollen joints may cause movement impairment, flattened facial bone and cartilage and narrowing of the trachea can contribute to upper airway disease [8,10]. MPS I hearts are often dilated, congestive heart failure is frequent in patients with Hurler syndrome, and both Hurler and Scheie phenotypes usually undergo valve replacement [11]. Additionally, reduced elasticity and increased breaks in the elastin structure of the aorta may occur [12].

The MPS I mouse model used in this study was established in 2003 by the disruption of the *Idua* gene with the neomycin resistance gene and has proven to be a useful model for studying the pathogenesis of the disease as well as for the development of treatment options [12–19].

As MPS I is a cumulative disease, intervention in the neonatal period allows the effects of gene therapy to be prophylactic, before lysosomal GAGs accumulation and related pathology occur, as treatments performed after GAGs accumulation has led to irreversible organ damage [18]. Additionally, treatment implemented at a later age would need to clear accumulated GAGs in addition to preventing additional deleterious effects, considering that clearance of preexisting storage may be a slow process [3,18].

We have previously reported that neonatal hydrodynamic injection of liposomal CRISPR/Cas9 complexes containing the murine *Idua* cDNA resulted in long-lasting detection of the enzyme mainly in the serum, lung and heart of MPS I mice. Furthermore, secreted IDUA was taken up from blood by other organs, except for the brain, and reduced GAGs storage in these organs, correcting the biochemical defect (Schuh *et al.*, data not published). To have a better insight of these results, in the present study we expand these analyses and report the effects of this therapy on bone, cardiovascular, respiratory, and brain abnormalities in liposome-treated MPS I mice.

MATERIALS AND METHODS

Animal procedures

Neonatal MPS I C57BL/6 mice (2-3 days old) (*Idua*-KO, kindly donated by Dr. Elizabeth Neufeld, UCLA, USA) (n= 4) were used for the experiments. MPS I mice were genotyped by PCR reaction as previously described [20] and maintained under standard conditions. Two control groups were used, untreated MPS I mice and normal six-month old mice (age of the animals at the time of euthanasia) (n= 6/group). The treatment consisted in one hydrodynamic injection (10% of body weight) of LA/ROSA26 complexes in the superficial temporal vein of neonatal MPS I mice, as previously described. At six months behavioral and echocardiographic tests were performed. Then mice were weighted and euthanized by cervical dislocation under anesthesia. Diameter of the ascending aorta was measured using a digital pachymeter (MTX, Brazil) and liver, lungs, kidneys, heart, testicles, aorta, and brain cortex were isolated and systematically divided in 2 pieces. One was flash frozen in liquid nitrogen for biochemical analysis and the other portion was fixed in buffered formalin. Thin cross sections were submitted to routine histologic processing, stained with hematoxylin–eosin/alcian blue and Verhoeff-van Gieson Stain, and then analyzed.

Echocardiographic assessment

Six-month-old mice were anesthetized with isoflurane and placed in left lateral decubitus position to obtain cardiac images. An EnVisor HD System, Philips Medical (Andover, Mass, USA), with a 12-4–MHz transducer was used, at 2-cm depth with fundamental and harmonic imaging. Images were captured by a trained operator with

experience in echocardiography of small animals. As measures of left ventricle function, we evaluated left ventricular ejection fraction, LV fraction shortening and fractional area change. As a measure of heart dilatation, we used the average of 3 measures of the heart diameter in systole (SD) and diastole (DD) using M-mode. All details of echocardiographic assessment were previously described [21].

Behavioral tests

Open field test

Locomotor and exploratory activities were assessed using an open field test. The test consisted of a square arena (52 x 52 cm²) with 60-cm high walls. The floor was divided into 16 squares by parallel and intersecting lines, obtaining 4 centered squares and 12 periphery squares. Mice were placed in one of the corners of the open field and (a) ambulation (number of times a mouse crossed with 4 paws one of the lines in the floor), and (b) exploratory behavior (rearings) were observed during 5 minutes for both control and MPS I animals.

Repeated open field test

This test is used as a measure of habituation memory [22]. In this test, mice are put in the open field apparatus for 5 minutes and activity (number of crossings and rearings) is measured. The test is repeated 30 and 60 minutes after the first trial to evaluate habituation to the new environment (a reduction in the activity should be observed in mice after each trial), and the results from the third trial are compared with the first one.

Inhibitory avoidance

The inhibitory avoidance test in rodents is a widely used animal model of aversively motivated learning and memory. The inhibitory avoidance training box was a 50 × 25 × 25-cm acrylic box whose floor consisted of parallel stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart (Insight, Sao Paulo, Brazil). We adapted a small platform (1 × 3 × 2 cm) in the center of the apparatus. The animal was gently placed in the platform and their latency to step-down on the grid with all four paws was recorded.

In the training session, immediately after stepping down on the grid, animals were given a 0.5 mA foot shock for 2 s. In retention test session, carried out 24 h after training (to evaluate long-term memory retention), no foot shocks were given and a maximum of 300 s was imposed in the step-down latency. The time when the animal stepped down was recorded and used for analysis.

Histological analyzes

The tissues were fixed with 10% buffered formalin, embedded in paraffin and submitted to semi-thin sections for the assembly of the histological slides. Hematoxylin-eosin (H&E) and Alcian-blue (1 %) staining were used to investigate the GAGs accumulation. At least 2 different slides from each animal were analyzed. Wall thickness of the ascending aorta was measured after Verhoeff-van Gieson staining by obtaining the average of at least 5 wall measurements in different points of the cut, as previously described [24]. Heart valve thickness was measured at 10 different points and the mean result was considered. Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) was evaluated by immunohistochemistry in 5-high power (400X magnification) fields as previously reported (Baldo et al, 2013). The microscope slides were analyzed under a microscope (Olympus BX51TF, JPN) (200x for overview images, or 400x for closer images).

Radiographs

Mouse limbs were isolated, cleaned of soft tissue, and radiographed as described [23]. Bone width in mice were measured on radiographs, and were evaluated and reported as width in mm.

Plethysmography

At the age of 6 months, all mice were anesthetized with intraperitoneal administration of ketamine/xylazine at 100 and 10 mg/kg, respectively. The trachea was cannulated, and the mice were mechanically ventilated at 150 strokes/min with a 150- μ l stroke volume. Mice were placed in a forced pulmonary maneuver system where pulmonary resistance and dynamic compliance were recorded using a FinePointe™ RC System (Buxco Research Systems, USA). Peak values were

designated as the maximum response with maximal lung resistance, and the units are kPa/(L/s) [24].

Ethics statement and statistics

This study was approved by the authors' institutional ethics committee on animal experimentation (Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - permit number #15-0416) and all experiments with animals were monitored by a veterinarian. IBM SPSS Statistics version 20 was used for statistical analysis. Possible gender effects were analyzed in all tests, and no significant differences were found between males and females if not specified. Results were compared using ANOVA and Tukey or Kruskal-Wallis and Mann-Whitney, as indicated. A Pearson test was used for correlation analysis. P values lower than 0.05 were considered statistically significant. GraphPad Prism 7 software was used to graphic design.

RESULTS

Mouse facial morphology and body weight

MPS I mice received a hydrodynamic injection at 2–3 days after birth with a liposomal complex containing a CRISPR/Cas9 plasmid and a plasmid containing the *Idua* cDNA. IDUA activity in serum was maintained at stable levels ranging from 5 to 7 % of normal in individual mice for 6 months, as previously reported and summarized in Table 5.1. We also observe an inverse correlation between GAGs levels at 6 months and IDUA activity in urine vs. serum, heart, and lungs (Supplementary Figure 5.1).

Figure 5.1A shows that an untreated MPS I mouse had a short, broad face at 6 months after birth. In contrast, the facial morphology of a liposome-treated mouse was in between of untreated MPS I and normal mouse. The average body weight of the liposome-treated MPS I male mice at 6 months was 32.6 ± 0.8 g [standard error of the mean (SEM)], as shown in Figure 5.1B. This was similar to that in age-matched normal male mice (31.1 ± 1.6 g) and was markedly lower than untreated MPS I males (34.7 ± 0.9 g; $p < 0.001$ for liposome-treated vs. untreated MPS I mice). Similarly, the average body weight of the liposome-treated MPS I female mice (28.8 ± 0.6 g) was lower than the

average weight of 29.4±0.8 g in the untreated MPS I females, although this difference was not statistically significant ($p>0.05$). The weights of the normal females were significantly lower than in the other groups (24.9±0.2 g).

Table 5.1. Effect of neonatal gene therapy on serum IDUA levels, urinary GAGs and pathology of visceral tissues.

Parameters	Normal (n=5)	MPS I (n=5)	Treated (n=5)
Serum IDUA (nmol/h/mL) ^a	6.14±0.11*	0.027±.014	0.40±0.050*
Urinary GAGs (µg/mg creatinine)	185.5±27.9*	510.5±45.9	356.2±17.4*
Brain cortex	0	++	++
Heart	0	++++	++,+,+,+
Kidney	0	++++	++
Liver	0	++++	++
Lung	0	++++	++,+,+,+

Mice were treated as described in Fig. 5.1.

^a The average serum Idua activity in nmol/h/mL for normal, untreated MPS I mice, and liposome-treated MPS I mice, are shown. The severity of pathological evidence of lysosomal storage disease at 6 months after birth was evaluated in the indicated tissues of normal, untreated MPS I, or liposome-treated MPS I mice. Pathology in brain cortex, heart, kidney, liver, and lung tissues were evaluated. 0 represents histology that is indistinguishable from normal; + represents animals in which storage was absent in some fields and present in others; ++ represents animals in which storage was present in all fields, but at low levels; +++ represents animals in which storage was present in all fields at moderate levels; and ++++ represents animals with large amounts of storage material in all fields. Unless otherwise indicated, results from all of the animals of each group in a particular tissue were concordant. For results that were discordant within the group, the results for each animal that was evaluated are shown. * $p<0.05$, when compared to untreated MPS I mice (Anova and Tukey post hoc).

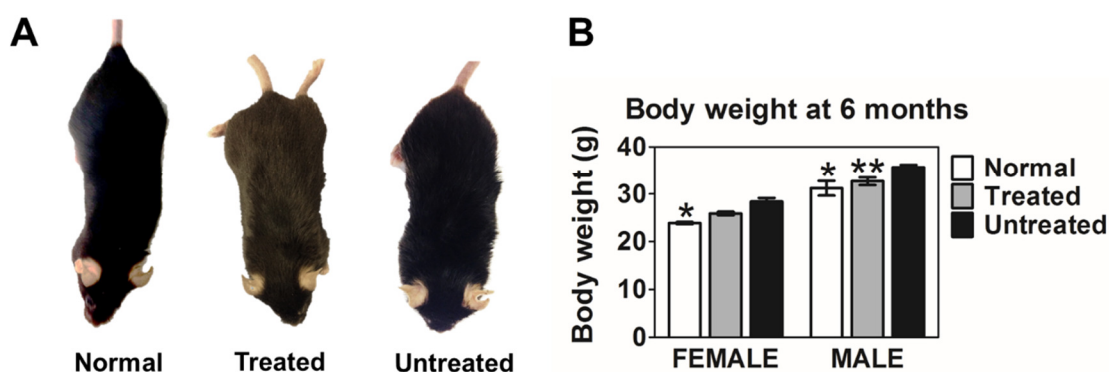


Figure 5.1. Facial morphology and body weight. Normal and untreated MPS I mice did not receive any injections prior to euthanasia. Liposome-treated MPS I mice were injected once with the liposome associated to a CRISPR/Cas9 plasmid and a donor plasmid of *Idua* cDNA in a volume corresponding to 10% of body weight of at 2–3 days after birth. **(A)** Facial morphology. Normal, liposome-treated, and untreated MPS I mice were photographed at 6 months of age. **(B)** Body weight. The weights for males (4 normal, 3 liposome-treated MPS I, and 4 untreated MPS I mice were evaluated) and females (4 normal, 2 liposome-treated MPS I, and 4 untreated MPS I mice were evaluated) were determined at 6 months of age, and averages for all animals in each group ± the standard error of the mean (SEM) are shown. Anova and Tukey post hoc, where * $p<0.05$, ** $p<0.005$, versus untreated. MPS I, mucopolysaccharidosis type I.

Bone Pathology

Radiographs of untreated MPS I mice (column 2 in Figure 5.2), demonstrated that the long femoral bone (panel 5.2B) and the zygomatic facial bone (panel 5.2A) were thick. These features were improved in the liposome-treated MPS I mice (column 3). Although the average width of the zygomatic bone was higher at 0.3 mm for liposome-treated mice (Figure 5.2C), there was significant difference when compared with values in untreated MPS I and normal mice ($p < 0.05$). The width of the femoral bone evaluated was significantly shorter in the liposome-treated MPS I mice (Figure 5.2C) than in the MPS I group, but not different from normal mice ($p < 0.05$).

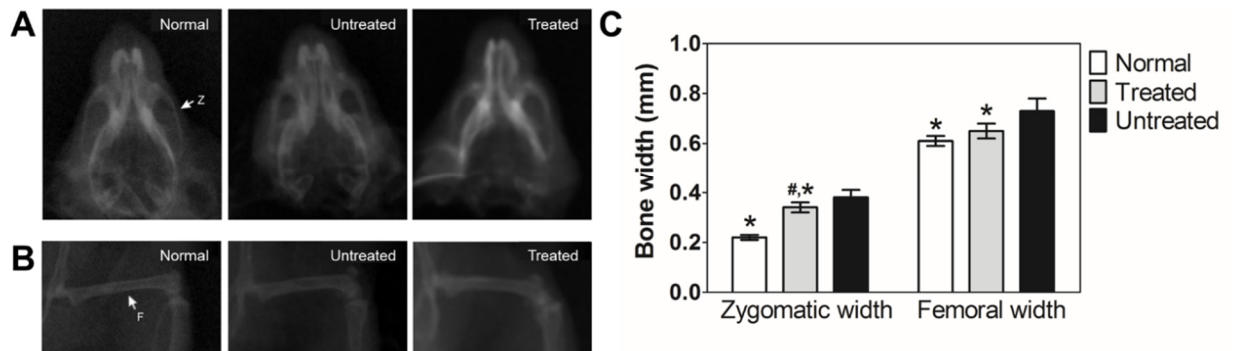


Figure 5.2. Effect of gene editing on bone abnormalities. Normal ($n = 14$), liposome-treated ($n = 5$), and untreated MPS I ($n = 14$) mice radiographs at 6 months of age. **(A)** Zygomatic bone (Z). **(B)** Femoral bone (F). **(C)** Bone width comparison (mm). Normal (white bars), treated (grey bars), and untreated MPS I mice (black bars). Averages for all animals in each group \pm the standard error of the mean (SEM) are shown. Anova and Tukey post hoc, where * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, (*) when significantly different from untreated and (#) from normal group. MPS I, mucopolysaccharidosis type I.

Cardiovascular disease

Echocardiographic analysis was performed in 6-month-old mice to assess heart function. A total of 3 parameters were analyzed (Figure 5.3). Evaluating left ventricular function and contractility, we obtained measures of left ventricular shortening fraction (Figure 5.3A), which was reduced in MPS I mice but was similar to normal in the treated group. We also obtained measures of systolic (Figure 5.3B) and diastolic diameters (Figure 5.3C), to assess heart dilatation and hypertrophy. Both were increased in MPS I mice, and normalized in the treated group.

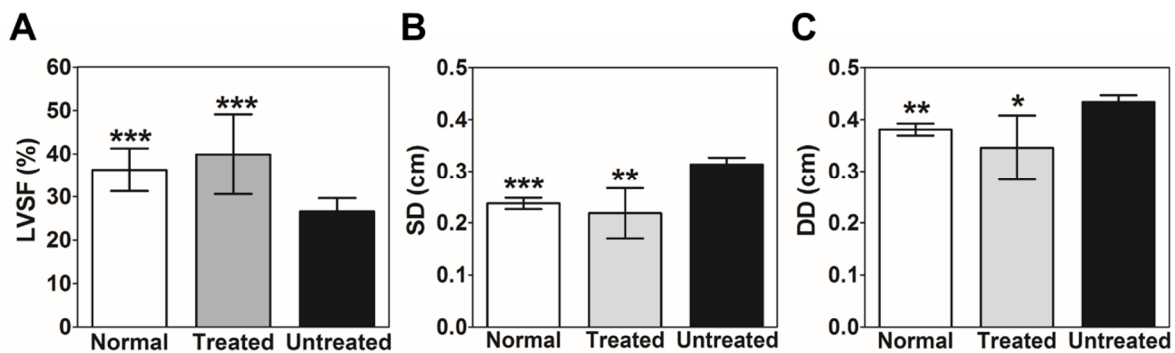


Figure 5.3. Cardiovascular parameters assessed by echocardiography. Normal (n= 14, white bars), liposome-treated (n= 5, grey bars), and untreated MPS I (n= 14, black bars) mice were submitted to echocardiography at 6 months of age. **(A)** LVSF, left ventricular shortening fraction. **(B)** SD, systolic diameter of the left ventricle. **(C)** DD, diastolic diameter of the left ventricle. Averages for all animals in each group \pm the standard error of the mean (SEM) are shown. Anova and Tukey post hoc, where * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0005$. MPS I, mucopolysaccharidosis type I. Liposome, liposomal carrier associated to the CRISPR/Cas9 plasmid and *Idua* donor plasmid.

Pathology in the aorta and heart valves

GAGs storage in the MPS I mouse myocardium could be visualized in histological sections from 6-month-old heart valves (Figure 5.4A).

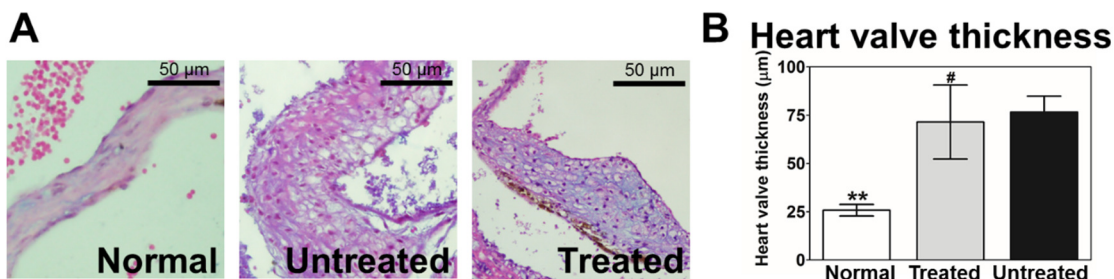


Figure 5.4. Heart valves thickening and GAGs storage. (A) Heart valve from the left ventricle of normal, untreated, and treated 6-month old MPS I mice. **(B)** Heart valve thickness at 6 months. Normal (white bar), treated (grey bar), and untreated MPS I mice (black bar). Thickening of the heart valves was measured in 10 different points, and the average value was recorded. Averages for all animals in each group \pm the standard error of the mean (SEM) are shown. Anova and Tukey post hoc, where * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0005$, (*) when significantly different from untreated and (#) from normal group. Magnification: 200x. MPS I, mucopolysaccharidosis type I. Liposome, liposomal carrier associated to the CRISPR/Cas9 plasmid and *Idua* donor plasmid.

Cells presenting GAGs storage were basically vacuolated interstitial cells. Heart valves were stained with H-E and Alcian blue for GAGs analysis since they were too small to quantify with a biochemical assay (Figure 5.4A). In addition, measuring the

valve thickness at 10 different points revealed that the heart valves were thickened in the MPS I mice (Figure 5.4B), and the treated group was not different from the untreated.

Analyzes of the aorta revealed that untreated MPS I mice presented increased aortic diameter and wall thickness (Figure 5.5A), with numerous white vacuoles in the tissue, which correspond to GAGs storage (Figure 5.5C). Treated mice presented decreased aortic diameter compared with MPS I mice, although there was still difference when compared to normal mice, which suggests a mild effect of treatment in this organ (Figure 5.5A).

When analyzing elastin breaks, one can observe that there was no difference between liposome-treated mice and normal or MPS I mice, demonstrating that the treated group was in between the two control groups (Figure 5.5B).

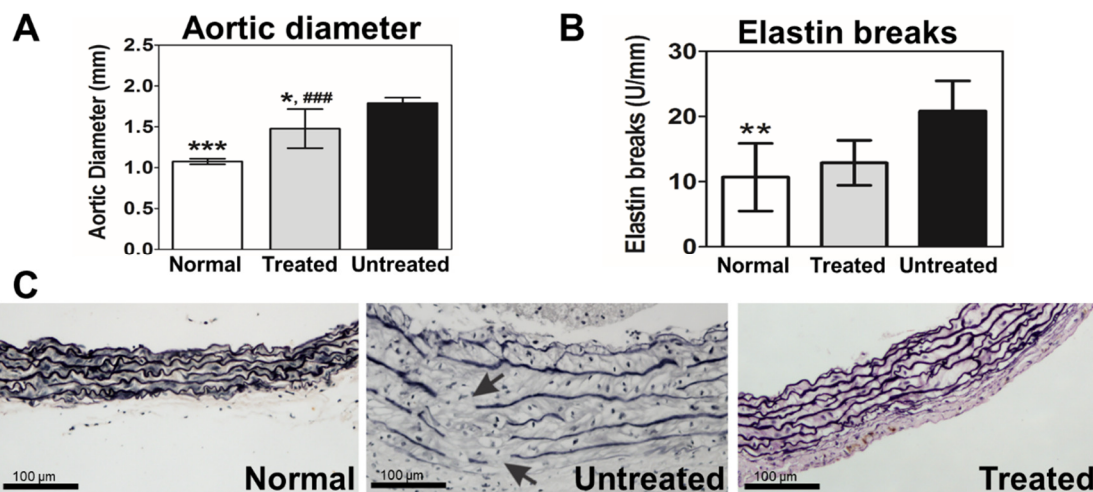


Figure 5.5. Pathology in the aorta. (A) Diameter of the ascending aorta at 6 months. **(B)** Elastin breaks at 6 months. **(C)** Aortic disease: Verhoeff–Van Gieson stain for elastic fiber content. Representative sections of an aorta from a Normal, an untreated, and a treated MPS I mice. Black arrows indicate GAGs storage and elastin breaks in the tissue. Averages for all animals in each group \pm the standard error of the mean (SEM) are shown. Anova and Tukey post hoc, where * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0005$, (*) when significantly different from untreated and (#) from normal group. Magnification: 200x. MPS I, mucopolysaccharidosis type I. Liposome, liposomal carrier associated to the CRISPR/Cas9 plasmid and *Idua* donor plasmid.

Respiratory disease

Lung resistance measured during plethysmography was used as a measure of obstructive airway disease [24]. In Figure 5.6 one can observe that MPS I mice presented higher lung resistance values, while treated mice were similar to normal mice, and both were significantly different from the untreated group.

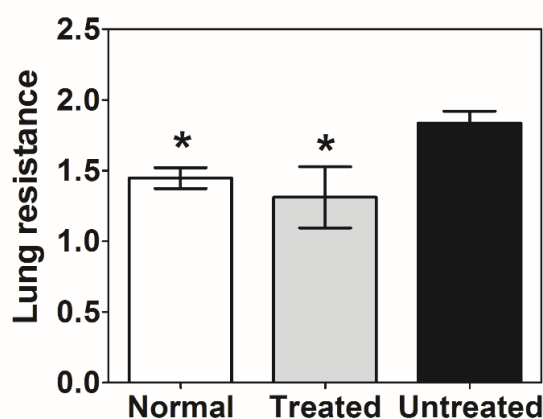


Figure 5.6. Respiratory disease. Lung resistance derived from plethysmography analysis from normal (white bar, n=5), treated (grey bar, n=3), and untreated MPS I mice (black bar, n=5). Averages for all animals in each group \pm the standard error of the mean (SEM) are shown. Anova and Tukey post-hoc, * $p < 0.05$. MPS I, mucopolysaccharidosis type I. Liposome, liposomal carrier associated to the CRISPR/Cas9 plasmid and *Idua* donor plasmid.

Behavior analysis and brain histology

As a measure of locomotor activity and exploratory behavior, animals were submitted to the open field test. MPS I mice presented reduced activity in both parameters, although not significantly different from treated or normal mice (Figure 5.7A and C). The repeated open field test is a measure of non-aversive memory, and MPS I mice showed impaired memory in horizontal activity in this test. However, there was no difference between groups (Figure 5.7B and D).

We only observed significant differences in the latency to step down the platform during the training session in the inhibitory avoidance apparatus (Figure 5.7E). Normal and treated mice presented low initial entrance latency displayed before the training in comparison with untreated animals. However, during the trial session 24 h after training, both untreated and treated MPS I mice presented a reduced time to step

down the platform, evidencing memory deficits, although there was no significantly difference between the groups (Figure 5.7F).

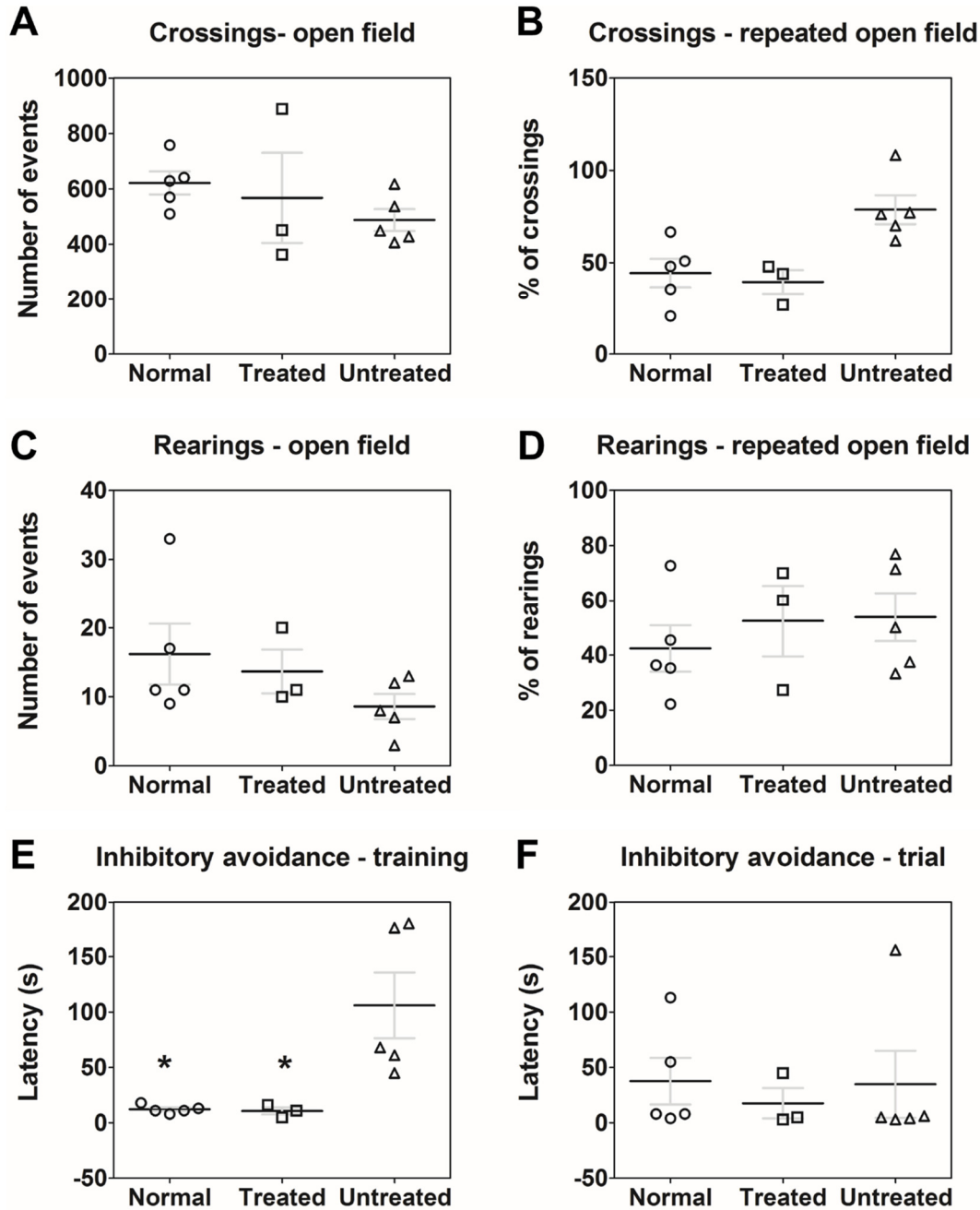


Figure 5.7. Behavior analysis: open field and inhibitory avoidance test. (A and C) Open field test. Mice were analyzed at 6 months and **(A)** Locomotor activity and **(B)** Exploratory behavior were compared among groups. **(C-D)** Repeated open field test. Three trials (with interval between trials of 30 minutes) were performed in the open field test and the activity of the third trial was compared with the first one in the **(A)** number of crossings and **(B)** number of rearings, represented as % of the first trial. **(E)** Results from the inhibitory avoidance test. Time to step down the platform during training session. **(F)** Time to step down the platform during trial session, 24 h after training. Dots represent individual mice and trace indicated average and standard deviation. Anova and Kruskal-Wallis, Dunns post hoc, * $p < 0.05$.

GFAP positive cells were increased in MPS I mice and in the treated group, which evidences that treatment was not able to reduce neuroinflammation to normal levels (Figure 5.8).

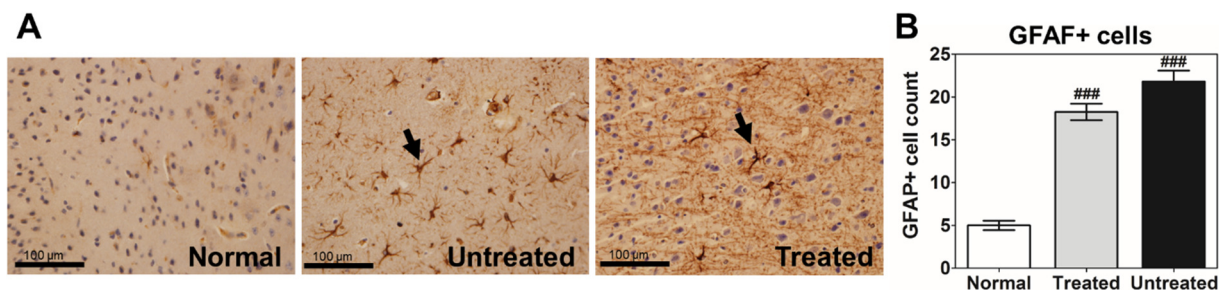


Figure 5.8. Neuroinflammation. (A) Glial fibrillary acidic protein (black arrows) was detected in the cortex of normal, untreated, and treated MPS I mice. (B) Quantification of GFAP positive cells in 10 high-power fields. Averages for all animals in each group \pm the standard error of the mean (SEM) are shown. Anova and Tukey post hoc, where # $p<0.05$, ## $p<0.005$, and ### $p<0.0005$. Magnification: 200x. MPS I, mucopolysaccharidosis type I.

DISCUSSION

We have previously shown that the treatment in newborn MPS I mice enabled constant production of IDUA by tissues and also its secretion. Furthermore, it significantly reduced urinary and tissue GAGs (Schuh *et al.*, data not published). The increased production of IDUA and reduced GAGs storage in some specific tissues as lungs and heart led to the expectation of finding functional improvements in these systems, as reported here. However, some other organs could also benefit from treatment despite low frequency of gene editing, since a fraction of the enzyme can be secreted into blood from the edited cells, and could be taken up by cells in other organs via the classical M6P receptor, in a process that would resemble ERT [25–27].

We extended the analysis of our previously reported findings in serum and tissue IDUA and GAGs levels at the present work, aiming to look at possible correlations. We consider particularly important the strong correlation between the reduction in urinary GAGs and the increase in serum IDUA activity observed here, as urine GAGs levels is the main biomarker used for monitoring therapeutic efficacy in clinical trials [28].

Looking at phenotype correction, body weight measurements were obtained at 6 months. Male treated mice showed improved results, and female mice did not reach

statistically significant values probably due to the small number of treated females. In addition, we could observe that facial morphology of liposome-treated mice was in between normal and untreated groups. This led us to perform X-ray analysis to obtain a quantitative measure of this improvement. The zygomatic bones showed lower widths in comparison to untreated mice, although not completely normalized. The femoral long bone width differed from MPS I as well, but not from the normal group. These results demonstrate the ability of the treatment to reach the bone tissue, although unfortunately not sufficiently to normalize bone width. It is important to point out that treatments such as ERT and even hematopoietic stem cell transplantation do not improve bone disease, because the enzyme does not reach the bone tissue [29–31]. Our results therefore might suggest that either our formulation might correct bone cells or our enzyme could be able to reach the bone through a still unknown mechanism. Our future studies will look at distribution and affinity of this specific formulation for the bone and evaluation of enzyme and tissue GAGs levels in this tissue as well, as it is clinically relevant [31,32].

The heart function was assessed by echocardiography. MPS I patients frequently develop heart disease, therefore we aimed to look at aspects of cardiac function [11]. The parameters of contractility of the left ventricle as well as heart dimensions in systole and diastole suggest that the treatment is able to prevent both left ventricle dysfunction and heart enlargement [12,15]. The thickness of the heart valves showed no improvement in treated mice, which suggest that the treatment may not be sufficiently efficient in preventing valve dysfunction. The heart valves are poorly vascularized, being composed mainly of collagen fibrils [33]. This characteristic may be likely responsible for a poor distribution of the enzyme through this tissue, and it could explain why our gene therapy approach failed in correcting this aspect of the disease. Previous work has shown that even with very high enzyme levels after gene therapy, the heart valves are still not completely normalized, and therefore are in agreement with our findings [34].

The ascending aorta is another tissue considered as “difficult-to-treat” by current therapies [18,35]. Therefore, it was unexpected that our liposome-treated mice presented intermediate results of wall thickness and aortic diameter, as well as lower count of elastin breaks. Although GAGs storage could still be observed in the treated

mice, and IDUA activity levels were not measured due to insufficient sample, these results highlight that the treatment approach could be a potential alternative to treat some of the most affected organs in MPS I.

The pulmonary function results of the treated group showed a tendency to lower lung resistance in comparison with untreated MPS I mice, in agreement with higher IDUA levels and lower GAGs levels found in this tissue. This parameter is important because upper and lower airway obstruction and restrictive pulmonary disease (which can lead to recurrent upper and lower respiratory tract infections, obstructive sleep apnea, impaired exercise tolerance, and respiratory failure) are very common in patients with MPS. These symptoms are often the first to appear and are responsible for morbidities in both children and adults with the disease [36,37].

It is a consensus that IDUA does not cross the blood-brain barrier in significant amount in human patients, although some researchers have shown that, in mice, a small fraction of the enzyme is able to reach the brain, when found in high levels in serum [21,38]. We had previously shown that IDUA activity in the brain of treated-mice was indeed undetectable, and GAGs levels were not reduced (Schuh, personal communication). We confirmed those finding with behavior analysis and GFAP content (as a marker of neuroinflammation) [13,17,22,39,40], which showed no improvement. These results confirm that the treatment is not able to reach the brain when applied intravenously, and new routes (intrathecal, nasal or *in situ*) will be tested in future studies.

Taken together, our set of results suggest deterioration of function in some organs (particularly heart valves and brain) while other organs, such as the cardiovascular system, the aorta, the bones and the lungs, seem to have their function at least partially normalized after neonatal treatment. It is important to notice that besides the lack of achievement of complete functional normalization of tissues, this treatment could be combined with other approaches to prevent some important deteriorations found in patients treated by current therapies.

CONCLUSION

These studies demonstrate that neonatal gene therapy can result in improvements in bone, heart, and lung pathologies, which are likely responsible for the improved mobility and decreased morbidity in mice. Achieving about 6% of normal IDUA levels in serum improved facial dysmorphism, bone width, heart and lung function, and aortic condition, possibly having a substantial effect in patients with the disease. Alternative strategies might involve transplantation of gene-modified autologous or normal allogeneic mesenchymal stem cells, or identification of ways to improve the delivery of IDUA to difficult-to-treat tissues through modifications of the protein or by increasing blood enzyme levels. The long term risks of any gene therapy approach need to be considered. However, we have not seen any evidence of tumors to date, and the administration of liposome to transgenic mice did not result in the development of tumors. Further studies will be necessary to evaluate this potential risk prior to implementation of this approach in patients. In conclusion, this set of results brings hope to the treatment of MPS I by gene editing with liposomes as nonviral carriers for the CRISPR/Cas9 system.

Declaration of interest

The authors were supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant numbers 470888/2014-8 and 141742/2014-3) and FIPE/HCPA (grant number 1504-16). R.S.S. would like to thank CNPq for the scholarship. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

REFERENCES

- [1] R. Giugliani, A. Federhen, M.V.M. Rojas, T. Vieira, O. Artigalás, L.L. Pinto, A.C. Azevedo, A. Acosta, C. Bonfim, C.M. Lourenço, C.A. Kim, D. Horovitz, D. Bonfim, D. Norato, D. Marinho, D. Palhares, E.S. Santos, E. Ribeiro, E. Valadares, F. Guarany, G.R. de Lucca, H. Pimentel, I.N. de Souza, J. Correa, J.C. Fraga, J.E. Goes, J.M. Cabral, J. Simionato, J. Llerena, L. Jardim, L. Giuliani, L.C.S. da Silva, M.L. Santos, M.A. Moreira, M. Kerstenetzky, M. Ribeiro, N. Ruas, P. Barrios, P. Aranda, R. Honjo, R. Boy, R. Costa, C. Souza, F.F. Alcantara, S.G.A. Avilla, S. Fagondes, A.M. Martins, Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment, *Genet. Mol. Biol.* 33 (2010) 589–604. doi:10.1590/S1415-47572010005000093.

- [2] C.E.M. Hollak, F.A. Wijburg, Treatment of lysosomal storage disorders: successes and challenges., *J. Inherit. Metab. Dis.* 37 (2014) 587–598. doi:10.1007/s10545-014-9718-3.
- [3] P. Patel, Y. Suzuki, A. Tanaka, H. Yabe, S. Kato, T. Shimada, R.W. Mason, K.E. Orii, T. Fukao, T. Orii, S. Tomatsu, Impact of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Therapy on Growth in Patients with Hunter Syndrome., *Mol. Genet. Metab. Reports.* 1 (2014) 184–196. doi:10.1016/j.ymgmr.2014.04.001.
- [4] J. Muenzer, J.E. Wraith, L.A. Clarke, Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines, *Pediatrics.* 123 (2009). doi:10.1542/peds.2008-0416.
- [5] R. Giugliani, Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries, *Genet. Mol. Biol.* 35 (2012) 924–931.
- [6] A. Hirth, A. Berg, G. Greve, Successful treatment of severe heart failure in an infant with Hurler syndrome, *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 820. doi:10.1007/s10545-007-0613-z.
- [7] O.I.I. Soliman, R.G.M. Timmermans, A. Nemes, W.B. Vletter, J.H.P. Wilson, F.J. ten Cate, M.L. Geleijnse, Cardiac abnormalities in adults with the attenuated form of mucopolysaccharidosis type I, *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 750–757. doi:10.1007/s10545-007-0586-y.
- [8] M.O. Chan, E.S. Sen, E. Hardy, P. Hensman, E. Wraith, S. Jones, T. Rapley, H.E. Foster, Assessment of musculoskeletal abnormalities in children with mucopolysaccharidoses using pGALS., *Pediatr. Rheumatol. Online J.* 12 (2014) 32. doi:10.1186/1546-0096-12-32.
- [9] D. Chan, A. Li, M. Yam, C. Li, T. Fok, Hurler's syndrome with cor pulmonale secondary to obstructive sleep apnoea treated by continuous positive airway pressure, *J. Paediatr. Child Health.* 39 (2003) 558–559. doi:10.1046/j.1440-1754.2003.00218.x.
- [10] C. Taylor, P. Brady, A. O'Meara, D. Moore, F. Dowling, E. Fogarty, Mobility in Hurler syndrome., *J. Pediatr. Orthop.* 28 (2008) 163–168. doi:10.1097/BPO.0b013e3181649e25.
- [11] E.A. Braunlin, P.R. Harmatz, M. Scarpa, B. Furlanetto, C. Kampmann, J.P. Loehr, K.P. Ponder, W.C. Roberts, H.M. Rosenfeld, R. Giugliani, Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: presentation, diagnosis and management., *J. Inherit. Metab. Dis.* 34 (2011) 1183–1197. doi:10.1007/s10545-011-9359-8.
- [12] G. Baldo, A.M.V. Tavares, E. Gonzalez, E. Poletto, F.Q. Mayer, U. da S. Matte, R. Giugliani, Progressive heart disease in mucopolysaccharidosis type I mice may be mediated by increased cathepsin B activity., *Cardiovasc. Pathol.* 27 (2017) 45–50. doi:10.1016/j.carpath.2017.01.001.
- [13] K. Ohmi, D.S. Greenberg, K.S. Rajavel, S. Ryazantsev, H.H. Li, E.F. Neufeld, Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and

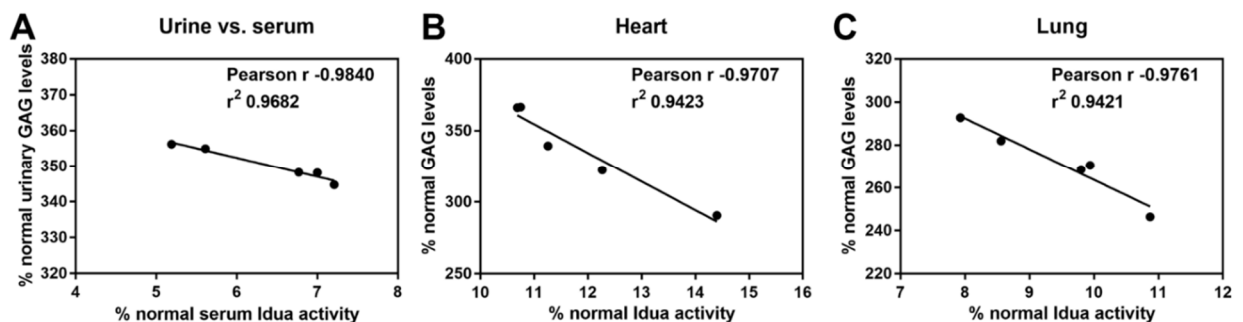
- IIIB., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 1902–1907. doi:10.1073/pnas.252784899.
- [14] P.G. de Oliveira, G. Baldo, F.Q. Mayer, B. Martinelli, L. Meurer, R. Giugliani, U. Matte, R.M. Xavier, Characterization of joint disease in mucopolysaccharidosis type I mice., *Int. J. Exp. Pathol.* 94 (2013) 305–311. doi:10.1111/iep.12033.
- [15] E. BRAUNLIN, S. MACKEY-BOJACK, A. PANOSKALTSIS-MORTARI, J. BERRY, R. MCELMURRY, M. RIDDLE, L. SUN, L. CLARKE, J. TOLAR, B. BLAZAR, Cardiac Functional and Histopathologic Findings in Humans and Mice with Mucopolysaccharidosis Type I: Implications for Assessment of Therapeutic Interventions in Hurler Syndrome., *Pediatr. Res.* 59 (2006) 27–32.
- [16] A.R. Garcia, J. Pan, J.C. Lamsa, J. Muenzer, The characterization of a murine model of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome)., *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 924–934. doi:10.1007/s10545-007-0641-8.
- [17] G. Baldo, F.Q. Mayer, B. Martinelli, A. Dilda, F. Meyer, K.P. Ponder, R. Giugliani, U. Matte, Evidence of a progressive motor dysfunction in Mucopolysaccharidosis type I mice, *Behav. Brain Res.* 233 (2012) 169–175. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.051.
- [18] A.P. Schneider, U. Matte, G. Pasqualim, A.M.V. Tavares, F.Q. Mayer, B. Martinelli, G. Ribas, C.R. Vargas, R. Giugliani, G. Baldo, Deleterious effects of interruption followed by reintroduction of enzyme replacement therapy on a lysosomal storage disorder., *Transl. Res.* 176 (2016) 29–37.e1. doi:10.1016/j.trsl.2016.05.002.
- [19] R. Schuh, G. Baldo, H. Teixeira, Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses, *Expert Opin. Drug Deliv.* 30 (2016) 1–10. doi:10.1080/17425247.2016.1202235.
- [20] G. Baldo, F. Quoos Mayer, M. Burin, J. Carrillo-Farga, U. Matte, R. Giugliani, Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human mucopolysaccharidosis type I cells., *Cells. Tissues. Organs.* 195 (2012) 323–329. doi:10.1159/000327532.
- [21] G. Baldo, F.Q. Mayer, B.Z. Martinelli, T.G. de Carvalho, F.S. Meyer, P.G. de Oliveira, L. Meurer, Á. Tavares, U. Matte, R. Giugliani, Enzyme replacement therapy started at birth improves outcome in difficult-to-treat organs in mucopolysaccharidosis I mice, *Mol. Genet. Metab.* 109 (2016) 33–40. doi:10.1016/j.ymgme.2013.03.005.
- [22] G. Baldo, D.M. Lorenzini, D.S. Santos, F.Q. Mayer, S. Vitry, S. Bigou, J.M. Heard, U. Matte, R. Giugliani, Shotgun proteomics reveals possible mechanisms for cognitive impairment in Mucopolysaccharidosis I mice., *Mol. Genet. Metab.* 114 (2015) 138–145. doi:10.1016/j.ymgme.2014.12.301.
- [23] M.S. Sands, J.E. Barker, C. Vogler, B. Levy, B. Gwynn, N. Galvin, W.S. Sly, E. Birkenmeier, Treatment of murine mucopolysaccharidosis type VII by syngeneic bone marrow transplantation in neonates., *Lab. Invest.* 68 (1993) 676–686.

- [24] C.P. Criée, S. Sorichter, H.J. Smith, P. Kardos, R. Merget, D. Heise, D. Berdel, D. Köhler, H. Magnussen, W. Marek, H. Mitfessel, K. Rasche, M. Rolke, H. Worth, R.A. Jörres, Body plethysmography – Its principles and clinical use, *Respir. Med.* 105 (2011) 959–971. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2011.02.006>.
- [25] S.D. Hartung, R.G. Reddy, C.B. Whitley, R.S. McIvor, Enzymatic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts by adeno-associated virus-mediated transduction of the alpha-L-iduronidase gene., *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 2163–2172. doi:[10.1089/10430349950017158](https://doi.org/10.1089/10430349950017158).
- [26] E.D. Kakkis, J. Muenzer, G.E. Tiller, L. Waber, J. Belmont, M. Passage, B. Izykowski, J. Phillips, R. Doroshov, I. Walot, R. Hoft, E.F. Neufeld, Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I., *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 182–188. doi:[10.1056/NEJM200101183440304](https://doi.org/10.1056/NEJM200101183440304).
- [27] E.S. Neufeld, J. Muenzer, The online metabolic and molecular basis of inherited disease, in: D. Valle, A.L. Beaudet, B. Vogelstein (Eds.), MacGraw Hill, New York, 2007.
- [28] S. Tomatsu, T. Fujii, M. Fukushi, T. Oguma, T. Shimada, M. Maeda, K. Kida, Y. Shibata, H. Futatsumori, A.M. Montaña, R.W. Mason, S. Yamaguchi, Y. Suzuki, T. Orii, Newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses, *Mol. Genet. Metab.* 110 (2013) 42–53. doi:[10.1016/j.ymgme.2013.06.007](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.06.007).
- [29] R. Parini, F. Deodato, M. Di Rocco, E. Lanino, F. Locatelli, C. Messina, A. Rovelli, M. Scarpa, Open issues in Mucopolysaccharidosis type I-Hurler, *Orphanet J. Rare Dis.* 12 (2017) 112. doi:[10.1186/s13023-017-0662-9](https://doi.org/10.1186/s13023-017-0662-9).
- [30] A. Pievani, I. Azario, L. Antolini, T. Shimada, P. Patel, C. Remoli, Neonatal bone marrow transplantation prevents bone pathology in a mouse model of mucopolysaccharidosis type I, *Blood.* 125 (2015). doi:[10.1182/blood-2014-06-581207](https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-581207).
- [31] S. Tomatsu, C.J. Alméciga-Díaz, A.M. Montaña, H. Yabe, A. Tanaka, V.C. Dung, R. Giugliani, F. Kubaski, R.W. Mason, E. Yasuda, K. Sawamoto, W. Mackenzie, Y. Suzuki, K.E. Orii, L.A. Barrera, W.S. Sly, T. Orii, Therapies for the bone in mucopolysaccharidoses, *Mol. Genet. Metab.* 114 (2015) 94–109. doi:[10.1016/j.ymgme.2014.12.001](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.12.001).
- [32] D.J. Rowan, S. Tomatsu, J.H. Grubb, B. Haupt, A.M. Montaña, H. Oikawa, A.C. Sosa, A. Chen, W.S. Sly, Long circulating enzyme replacement therapy rescues bone pathology in mucopolysaccharidosis VII murine model, *Mol. Genet. Metab.* 107 (2012) 161–172. doi:[10.1016/j.ymgme.2012.07.002](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.07.002).
- [33] R.B. Hinton, K.E. Yutzey, Heart Valve Structure and Function in Development and Disease, *Annu. Rev. Physiol.* 73 (2011) 29–46. doi:[10.1146/annurev-physiol-012110-142145](https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142145).
- [34] P.W. Bigg, G. Baldo, M.M. Sleeper, P.A. O'Donnell, H. Bai, V.R.P. Rokkam, Y. Liu, S. Wu, R. Giugliani, M.L. Casal, M.E. Haskins, K.P. Ponder, Pathogenesis of mitral valve disease in mucopolysaccharidosis VII dogs., *Mol. Genet. Metab.*

110 (2013) 319–328. doi:10.1016/j.ymgme.2013.06.013.

- [35] G. Baldo, Mucopolissacaridoses : mecanismos patogênicos e abordagens terapêuticas baseadas em terapia gênica e reposição enzimática, (2012).
- [36] K.I. Berger, S.C. Fagondes, R. Giugliani, K.A. Hardy, K.S. Lee, C. McArdle, M. Scarpa, M.J. Tobin, S.A. Ward, D.M. Rapoport, Respiratory and sleep disorders in mucopolysaccharidosis, *J. Inherit. Metab. Dis.* 36 (2013) 201–210. doi:10.1007/s10545-012-9555-1.
- [37] M.S. Muhlebach, W. Wooten, J. Muenzer, Respiratory manifestations in mucopolysaccharidoses., *Paediatr. Respir. Rev.* 12 (2011) 133–138. doi:10.1016/j.prrv.2010.10.005.
- [38] L. Ou, T. Herzog, B.L. Koniar, R. Gunther, C.B. Whitley, High-dose enzyme replacement therapy in murine Hurler syndrome., *Mol. Genet. Metab.* 111 (2014) 116–122. doi:10.1016/j.ymgme.2013.09.008.
- [39] J.P. O’Callaghan, K. Sriram, Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity., *Expert Opin. Drug Saf.* 4 (2005) 433–442. doi:10.1517/14740338.4.3.433.
- [40] K. Siemionow, A. Klimczak, G. Brzezicki, M. Siemionow, R.F. McLain, The effects of inflammation on glial fibrillary acidic protein expression in satellite cells of the dorsal root ganglion., *Spine (Phila. Pa. 1976).* 34 (2009) 1631–1637. doi:10.1097/BRS.0b013e3181ab1f68.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Suppl. figure 1. Correlation between GAGs levels and IDUA activity in (A) urine GAGs *versus* serum IDUA, (B) heart, and (C) lung, which showed an inverse correlation with IDUA activity and GAGs levels found in treated MPS I mice ($P < 0.01$, Pearson test).

DISCUSSÃO GERAL

A MPS I é causada pela deficiência de IDUA e tem como consequência o acúmulo de GAGs não degradados nos lisossomos, provocando uma série de sintomas multissistêmicos (GIUGLIANI, 2012). Os tratamentos disponíveis para a MPS I são o TCTH e a TRE, ambos com limitações que incentivam a pesquisa de novos tratamentos, a fim de encontrar uma terapia que seja mais duradoura e melhore as condições clínicas dos pacientes, como a terapia gênica (CARVALHO et al., 2015; GIUGLIANI et al., 2012; SCHUH; BALDO; TEIXEIRA, 2016).

Na terapia gênica, o carregamento do gene de interesse normalmente ocorre através da utilização de vetores virais ou não-virais. Os vetores virais possuem alta eficiência de penetração celular e transferência do transgene, porém possuem possibilidade de mutagênese insercional e podem provocar reações imunogênicas (BALDO; GIUGLIANI; MATTE, 2014). Os vetores não-virais são considerados mais seguros, estáveis e de fácil produção (SCHUH; BALDO; TEIXEIRA, 2016). Os lipossomas (FENSKE; CHONN; CULLIS, 2008) e as nanoemulsões (FRAGA et al., 2015a) são exemplos de sistemas carreadores lipídicos não-virais. Esses vetores possuem pelo menos uma matéria prima catiônica que tem disponibilidade de estabelecer interações eletrostáticas com os grupamentos fosfato aniônicos dos ácidos nucléicos e, assim, permitem sua complexação e conseqüentemente protegem o DNA da degradação.

Nosso grupo de pesquisa descreveu a complexação de um plasmídeo doador da sequência codificante para o gene *IDUA* com nanoemulsões catiônicas (FRAGA et al., 2015a, 2015b, 2017). Entretanto, a curta duração da expressão gênica do plasmídeo episomal fez com que o projeto avaliasse em estudos subsequentes as potencialidades de sistemas de edição gênica que tornassem a expressão do transgene mais duradoura, idealmente vitalícia. Nesse contexto, o presente estudo teve como principal objetivo utilizar nanocarreadores lipídicos como vetores não-virais para o sistema CRISPR/Cas9 para edição gênica da MPS I.

Na primeira etapa da presente tese, visamos realizar um compilado das terapias disponibilizadas mais recentemente e das últimas abordagens em ensaios clínicos para o tratamento das MPS. Também discutimos os principais tipos de biomateriais e carreadores não-virais que poderiam ser utilizados, e ainda sua

possível aplicação em novas terapias, especialmente voltadas para pesquisadores da área biomédica.

Em sequência, investigamos a co-complexação de nanoemulsões produzidas por homogeneização a alta pressão associadas a um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e um oligonucleotídeo contendo a sequência correta do gene *IDUA* a fim de corrigir a mutação Trp402* em fibroblastos de pacientes MPS I.

Quanto à construção do vetor do sistema CRISPR/Cas9, embora estudos recentes sugiram o uso de múltiplas sequências de gRNA, optamos por testar apenas uma sequência pois este primeiro estudo tinha como objetivo apenas realizar a prova de conceito da correção gênica. A escolha da sequência foi baseada numa ferramenta online, que demonstrou que não haviam potenciais sítios *off-target* no genoma, considerando diferenças em até 3 bases na sequência do gRNA. O tamanho do oligonucleotídeo de recombinação foi escolhido baseado em dados da literatura (WANG et al., 2013), que sugerem que regiões flanqueadoras de 50-60 pb produzem resultados ótimos de recombinação.

As nanoemulsões carreadoras foram produzidas por homogeneização a alta pressão com e sem a adição de um fosfolípido peguado (DSPE-PEG), e foram associadas aos ácidos nucleicos por dois métodos diferentes: adsorção à superfície ou encapsulamento no núcleo oleoso.

Demonstrou-se que há diferença na estabilidade dos complexos produzidos pelos diferentes métodos, e o encapsulamento pode promover um maior tempo de retenção dos ácidos nucleicos. Tais resultados indicam que a internalização do DNA (ou pelo menos a sua internalização parcial) no núcleo oleoso de nanoemulsões pode desempenhar um papel na liberação do plasmídeo a partir dos complexos, demonstrando que os complexos encapsulados podem ser excelentes alternativas para administração *in vivo*. Para transfecção *in vitro* seria ideal uma formulação que libere o DNA mais facilmente, porém inicialmente protegendo-o da degradação. Entretanto, não se observou diferença na eficiência de transfecção celular entre os dois tratamentos, o que demonstra que ambos são capazes de associar e proteger os ácidos nucleicos, e em seguida liberá-los no interior da célula. O aumento significativo da atividade enzimática e a redução da área dos lisossomos

demonstraram que os carreadores foram efetivos independentemente do método de associação do DNA.

Apesar dos resultados biológicos terem sido extremamente satisfatórios, não foi possível demonstrar a eficiência e porcentagem de correção da mutação *in vitro*. De fato, tentamos executar diversos experimentos de sequenciamento de nova geração (Next Generation Deep Sequencing – NGS) do DNA genômico obtido a partir dos fibroblastos transfectados utilizando um painel usado no diagnóstico de pacientes com MPS, analisado no equipamento Ion Torrent® (ThermoFisher, USA). No entanto, ocorreu um problema: apesar da purificação com o protocolo ExoSAP™ (Invitrogen, USA) para purificação de primers e fragmentos para sequenciamento automatizado de DNA usando SAP e Exonuclease I, a cobertura (o número de leituras) em nosso sítio corrigido foi excessivamente alta, cerca de 10-20 vezes superior à cobertura encontrada numa amostra não-corrigida. Isso ocorreu ao ponto em que os autores acreditam que o oligonucleotídeo usado para RH ainda estava presente e também estava sendo sequenciado. A partir dessa dúvida tomamos a decisão de não utilizar os dados de sequenciamento, uma vez que não são confiáveis. A Figura 5 demonstra um exemplo das análises resultantes.

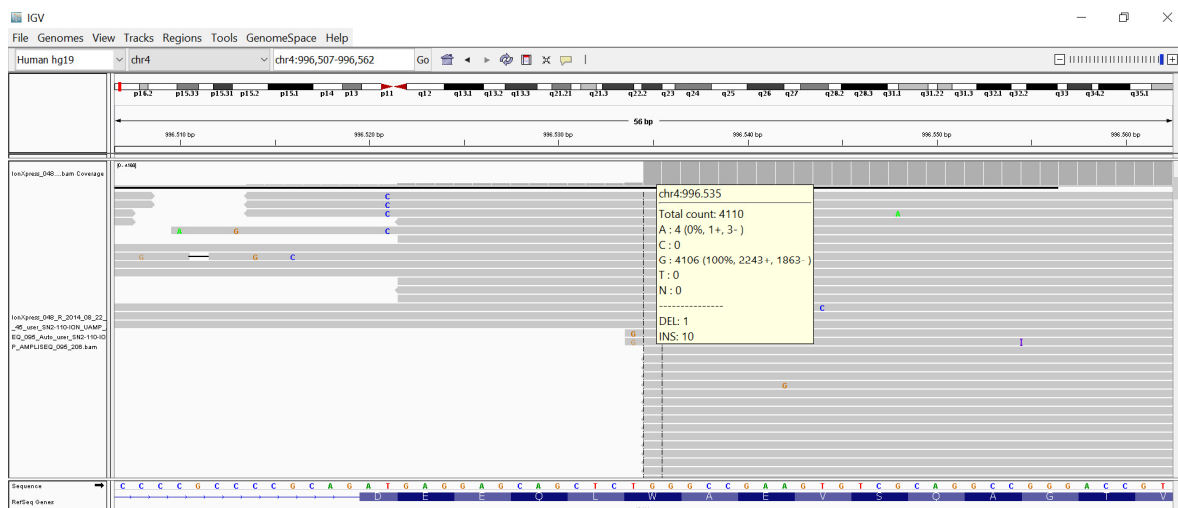


Figura 5. Visualização do NGS (sequenciamento de nova geração) de uma amostra de DNA genômico após transfecção com os complexos. O número de leituras na região editada foi de 4106 leituras, contra uma média de 400 leituras num controle não-editado.

Parece que, mesmo com a purificação com a enzima, o NGS ainda analisou o fragmento correspondente ao oligonucleotídeo usado como modelo para RH,

mostrando 100% de correção da mutação pontual presente na variante Trp402* (G>A). Como o número de contagens também foi excessivo, concluímos que o experimento não produziu dados confiáveis. Outras tentativas de eliminar o excesso de oligonucleotídeo também não foram bem-sucedidas, como eletroforese em gel de agarose e excesso de ExoSap.

Embora os resultados de sequenciamento tenham sido inconclusivos, os experimentos adicionais (de atividade enzimática e quantificação de massa lisossômica) puderam confirmar que realmente o tratamento proporcionou uma correção de parte das células, sendo uma importante prova de conceito de que o sistema pode ser utilizado para correção gênica da principal mutação encontrada nos pacientes com MPS I.

Após os experimentos *in vitro* iniciais, lançou-se mão da técnica de microfluidização para obtenção de carreadores lipídicos de tamanho reduzido. A microfluídica é uma tecnologia versátil para manipular fluxos de líquidos através de inúmeros canais com dimensões diminutas de cerca de 100 µm, provocando o cisalhamento e a consequente redução do tamanho das partículas. Os microfluidizadores podem fornecer uma mistura rápida e ajustável, um ambiente de reação homogêneo e tamanhos de gotículas/vesículas na ordem de dezenas de nanômetros. Portanto, é uma tecnologia atraente para produção de vetores para terapia gênica, que devem ser pequenos o suficiente para garantirem sua entrada na célula (YU; LEE; LEE, 2009). Nesse contexto, visamos inicialmente otimizar as condições de preparação dos carreadores lipídicos no equipamento e após, realizar a caracterização físico-química dos carreadores e complexos.

Considerando-se que, em alguns casos, o sistema CRISPR/Cas pode envolver a entrega de uma ou mais sequências de ácidos nucleicos, o objetivo principal do estudo foi verificar se havia implicações na utilização de complexos que envolvessem esse tipo de carreamento ou co-complexação. É importante frisar que até o presente momento não há estudos na literatura que contemplem esses objetivos. Os experimentos iniciais foram importantes pois determinaram o número de ciclos de homogeneização que seriam utilizados nos experimentos posteriores. Com isso, demonstrou-se a viabilidade da obtenção de nanoemulsões e lipossomas

com tamanho reduzido de gotícula/vesícula em pelo menos 1/3 em comparação com o método de homogeneização a alta pressão utilizado nos estudos anteriores da presente tese (Capítulo 2) e do grupo de pesquisa (FRAGA et al., 2015c, 2017). Outra constatação importante foi a distribuição uniforme dos tamanhos de gotícula das formulações brancas e dos complexos, sendo que o tamanho reduzido das formulações peguladas (LP) refletiu a presença de DSPE-PEG, que melhora a estabilidade dos complexos produzindo nanoestruturas mais estáveis e de menor tamanho (CHAN et al., 2012; IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006; LOVELYN; ATTAMA, 2011). A presença de PEG demonstrou ser essencial para a estabilidade, pois a partir do ensaio de descomplexação em meio de cultura a formulação lipossomal não-pegulada demonstrou agregação e precipitação (Figura 6B) e foi excluída devido à baixa estabilidade, enquanto os complexos pegulados permaneceram estáveis mesmo na presença de eletrólitos do meio (Figura 6A).

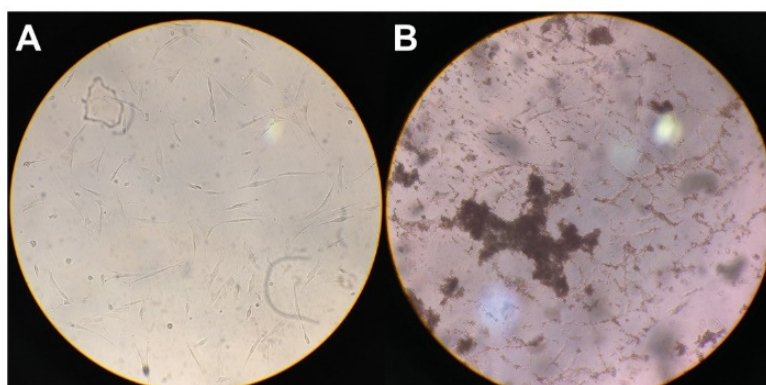


Figura 6. Visualização pelo microscópio óptico da incubação de nanoemulsões peguladas (A) e nanoemulsões sem adição de DSPE-PEG (B) com meio de cultura DMEM em cultura de fibroblastos (magnificação 200x).

Os demais resultados demonstraram que os ácidos nucleicos parecem associar-se de maneira diferente com as duas formulações, demonstrando uma liberação mais rápida quando complexados aos lipossomas. Essa capacidade de complexação do DNA garante que o carregamento seja realizado protegendo os ácidos nucleicos da degradação por nucleases. Já a descomplexação é necessária após um certo período de tempo, no intuito do plasmídeo e o oligonucleotídeo alcançarem o núcleo da célula, visto que as nanoestruturas não penetram na carioteca. Quanto aos testes *in vitro*, os ensaios de captação celular com o lipídio NBD-PE demonstraram a capacidade dos lipossomas e nanoemulsões de

penetrarem no interior de três tipos celulares: fibroblastos, Hep-G2 e HEK-293. As imagens demonstraram uma grande concentração das nanoestruturas no interior das células, corroborando com os resultados da quantificação por citometria de fluxo, que demonstrou que o tipo celular é um determinante importante e decisivo para a transfecção dos complexos. Entretanto, o tipo de carreador e o tamanho e quantidade de sequências de ácidos nucleicos associados não parecem interferir na eficiência de penetração celular, enquanto a relação de cargas parece ser o determinante para o sucesso.

Após a constatação de que não haveria implicações quanto ao uso dos carreadores e das sequências de ácidos nucleicos escolhidas para os experimentos *in vitro* e *in vivo*, o próximo objetivo foi a avaliação biológica dos complexos. Primeiramente, a fim de verificar a capacidade de transfecção e o comportamento biológico dos complexos lipossomais, realizou-se os mesmos experimentos *in vitro* dos estudos anteriores (Capítulo 2) através da utilização dos lipossomas produzidos por microfluidização complexados ao sistema CRISPR/Cas9 e ao oligonucleotídeo contendo a sequência *wild type* (normal) do gene *IDUA* para edição gênica em fibroblastos de pacientes MPS I com a mutação Trp402*.

A eficiência de transfecção do complexo LA foi avaliada pela atividade de *IDUA* nos fibroblastos e no meio de cultura. Os resultados corroboraram com os achados no estudo anteriormente realizado no capítulo 2, e níveis significativos de atividade enzimática foram detectados após 2, 15 e 30 dias de cultura, não havendo diferença significativa entre o tratamento com o complexo lipossomal, com a nanoemulsão contendo os ácidos nucleicos encapsulados (NE) nem com a que os continha adsorvidos (NA). Esses resultados podem refletir a correção das células e a existência de atividade de *IDUA* no meio indica que a enzima está sendo liberada das células e está disponível para internalização pelas outras células adjacentes que não produzem *IDUA* (HARTUNG et al., 1999; KEELING et al., 2001). Uma explicação possível para a redução da atividade enzimática ao longo do tempo, apesar de ainda ser significativa, é que o número de células não modificadas pode exceder o número de modificadas, assim a enzima se dilui muito no meio de cultura e na ressuspensão das células. As células modificadas podem ter sua membrana lesada pelos agentes de transfecção, podem entrar em apoptose por clivagens *off-*

target da Cas9 ou, ainda, podem ter alterações metabólicas pela produção da enzima até então desconhecida pela célula.

Em geral, as conclusões obtidas a partir das imagens observadas ao microscópio confocal puderam ser confirmadas por citometria de fluxo, e sugeriram que o tratamento reduziu progressivamente o número de lisossomos e o fenótipo das células aproximou-se à morfologia das normais. O acúmulo de GAGs em células homozigotas Trp402* está associado com uma superabundância de lisossomos que possuem morfologia anormal (BIOULAC et al., 1975; KEELING et al., 2001). Independentemente da quantidade de células corrigidas pelos tratamentos, a melhora generalizada observada nos lisossomos pode estar relacionada com o fenômeno de correção cruzada (ARONOVICH et al., 2009; HARTUNG et al., 1999; KEELING et al., 2001), que é a capacidade que as células que expressam a enzima possuem de corrigir as células vizinhas que são deficientes. Esse efeito é possível pois cerca de 10 % das enzimas lisossomais produzidas são secretadas a partir das células para a circulação ou para o meio extracelular. As enzimas lisossomais circulantes são absorvidas pelas células vizinhas através de receptores de manose-6-fosfato (M6PR), através de endocitose mediada pelo receptor. Assim, para uma terapia eficaz, um número relativamente pequeno de células que expressam a enzima IDUA são necessárias para corrigir muitas outras células que são incapazes de produzir a enzima (BRADY; YANG; ZHUANG, 2013). Há relatos de que apenas 1 % de atividade enzimática seria suficiente para atenuar fenótipos graves *in vitro* (KEELING et al., 2001). Os resultados globais refletem a correção efetiva da mutação Trp402* em fibroblastos de pacientes MPS I. A produção da enzima IDUA e a redução do número e melhora do fenótipo dos lisossomos comprovam a capacidade dos três carreadores lipídicos nanoestruturados (LA, NA e NE) em liberar o plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 no meio intracelular. Contudo, o sistema lipossomal demonstrou ser mais efetivo no carreamento do DNA, pois demonstrou reduzir o número de lisossomos mais rapidamente em comparação com as nanoemulsões.

Em vista dos promissores resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, objetivou-se realizar experimentos *in vivo*. Assim, na etapa seguinte verificamos a viabilidade de produzir lipossomas e nanoemulsões peguillados como carreadores

de um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e um plasmídeo doador da sequência de DNA codificante para a enzima *Idua* para fins de recombinação homóloga no locus ROSA26. É interessante ratificar que o modelo animal de MPS I utilizado possui o gene da neomicina invertido no meio da sequência genômica do gene *Idua*, que leva este gene a *knockout*. Assim, escolhemos o locus ROSA26 para integração do transgene *Idua*, principalmente por ser um locus seguro e de expressão gênica sustentada (NANCHI et al., 2015). Esse tipo de abordagem (inserção de um gene ou cDNA inteiro em um ponto seguro no genoma em vez de uma correção mutação-específica) permite o desenvolvimento de uma plataforma de terapia gênica com um desenho de sequências que pode ser utilizada para múltiplas doenças, pois o ponto de clivagem no genoma é sempre o mesmo, apenas alternando-se o gene de interesse (ANGUELA et al., 2013).

Os tratamentos foram realizados através de injeção hidrodinâmica na veia temporal superficial de camundongos MPS I neonatos. Essa injeção possui grande capacidade de produzir resultados por forçar a passagem de um grande volume de líquido pelo interstício, e assim penetrar nas células (YAN et al., 2012). Porém, certa mortalidade de animais está associada a esse método e as chances de sucesso da injeção são baixas, sendo que somente 35% dos animais foram perfeitamente injetados e puderam ser utilizados em nossos experimentos.

Inicialmente, foram realizados testes piloto de injeção com as nanoemulsões e lipossomas a fim de estabelecer aplicações reprodutíveis, visto que o local de injeção é muito sensível ao extravasamento e de difícil visualização (Figura 7).

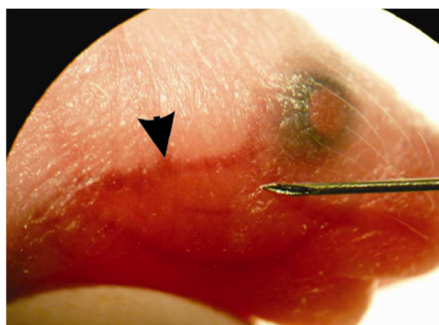


Figura 7. Visualização da veia temporal superficial de camundongo MPS I neonato. A seta indica a localização da inserção da agulha para injeção. MPS I = mucopolissacaridose tipo I. Reproduzido de Baldo, 2012.

Após a injeção, todos os animais que receberam o complexo formado pela nanoemulsão em volume correspondente a 10% do peso corporal vieram a óbito (n injeção = 5). A causa provável poderia ser embolia pulmonar devido à presença de maior concentração lipídica nas nanoemulsões, ocorrência previamente descrita em diversos estudos (ESTEBE; MALLEDANT, 1991; FEIN et al., 2009; HULMAN, 1995; LEKKA et al., 2004; MILLER et al., 2012). Entretanto, quando o complexo lipossomal foi injetado, os camundongos demonstraram maior resistência e sobrevivência, com 2 sobreviventes (n injeção=5), provavelmente pela menor concentração lipídica e menor tamanho e índice de polidispersão desses carreadores. Dessa forma, optamos por utilizar somente os lipossomas nos experimentos *in vivo*.

É possível ressaltar que em estudos anteriores do grupo de pesquisa injetamos com sucesso nanoemulsões carreadoras do plasmídeo pIDUA na veia da cauda de animais adultos, e o volume máximo de injeção foi de 1% do peso corporal dos animais (FRAGA et al., 2015b, 2015d, 2017), consistindo em um protocolo bem diferente do objetivado no presente estudo.

Em vista do sucesso das injeções após o treinamento, a primeira avaliação a ser realizada foi a de biodistribuição dos complexos lipossomais fluorescentes. Surpreendentemente, apesar da injeção ser hidrodinâmica, os complexos tiveram principalmente uma maior afinidade pelos pulmões e coração, e em menor extensão pelo fígado.

Após a injeção neonatal, os animais foram monitorados mensalmente e demonstraram um aumento significativo de cerca de 6% na atividade sérica de Idua em relação aos valores encontrados em camundongos normais, e o resultado foi mantido por seis meses. Em comparação com o grupo injetado com plasmídeo nu, os resultados foram significativamente melhores, denotando uma melhor capacidade de transfecção dos complexos lipossomais.

Após seis meses realizou-se a eutanásia e foram observados aumentos significativos na atividade enzimática especialmente no pulmão, coração, fígado e rim; os mesmos órgãos que tiveram evidenciada a captura dos complexos marcados com sonda fluorescente. Corroborando os resultados da atividade de IDUA, foi demonstrada a redução significativa dos GAGs acumulados na urina e nesses

tecidos, evidenciada pela análise histológica. Em contraste, os animais injetados com os plasmídeos nus demonstraram similaridade com resultados bem estabelecidos de outros grupos de pesquisa (BONAMASSA; HAI; LIU, 2011; PRESTON; PELLEGRINI; EBERT, 2016; SEBESTYEN et al., 2006; YAN et al., 2012), em que prevalece a afinidade pelo fígado. Uma análise global dos resultados demonstra que os complexos foram efetivos como prova de conceito da edição gênica em camundongos MPS I.

Os resultados promissores da presente tese nos levaram a proteger a produção intelectual dos carreadores para edição gênica *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, através de depósito da propriedade intelectual no INPI (Anexo 1).

Em consequência aos resultados obtidos, objetivamos investigar mais profundamente os efeitos do aumento da atividade enzimática e redução dos níveis de GAGs na morfologia da face e ossos e fisiologia dos sistemas cardiovascular e respiratório, além de possíveis efeitos no cérebro e comportamento dos animais. As principais conclusões são preliminares pois o estudo ainda está em andamento, porém já sugerem que o aumento da atividade enzimática está diretamente correlacionado à melhora da função dos órgãos, com resultados em geral considerados intermediários entre camundongos normais e MPS I. Ocorreu melhora na aparência dos animais, na hipertrofia cardíaca e aorta, função pulmonar, e inclusive na espessura dos ossos, não havendo progresso somente no cérebro e comportamento. Os resultados encontrados nesse estudo aparentam similaridades com estudos realizados com transdução viral, em que ocorre um aumento de atividade enzimática de 10 vezes a atividade normal, e mesmo assim a aorta e ossos não demonstram importante melhora clínica (METCALF et al., 2010). Também é importante enfatizar que a avaliação pulmonar de camundongos MPS I por pletismografia nunca foi relatada, demonstrando o ineditismo desse tipo de análise.

Em contrapartida dos desfechos positivos obtidos na presente tese, a partir dos resultados não significativos de atividade de IDUA e redução de GAGs no cérebro dos camundongos MPS I, foi possível concluir que os complexos não foram efetivos para editar as células do sistema nervoso em quantidades relevantes. Considerando-se que a enzima não ultrapassa a BHE, não ocorreu redistribuição da

enzima sérica, mesmo que isso tenha ocorrido em outros tecidos. Com base nessas afirmações e em experimentos anteriores do grupo de pesquisa (Schuh *et al.*, Dados não publicados), foram realizados testes piloto em animais MPS I adultos com o intuito de formular um carreador capaz de transfectar células do sistema nervoso, e esse seria entregue por via nasal, menos invasiva e de maior aderência ao tratamento pelos pacientes. Como obtivemos resultados positivos e satisfatórios, foi realizado um depósito da proteção da propriedade intelectual junto ao INPI (Anexo 2) que demonstra a obtenção de carreadores para terapia gênica do sistema nervoso central (Figura 8, Dados não publicados).

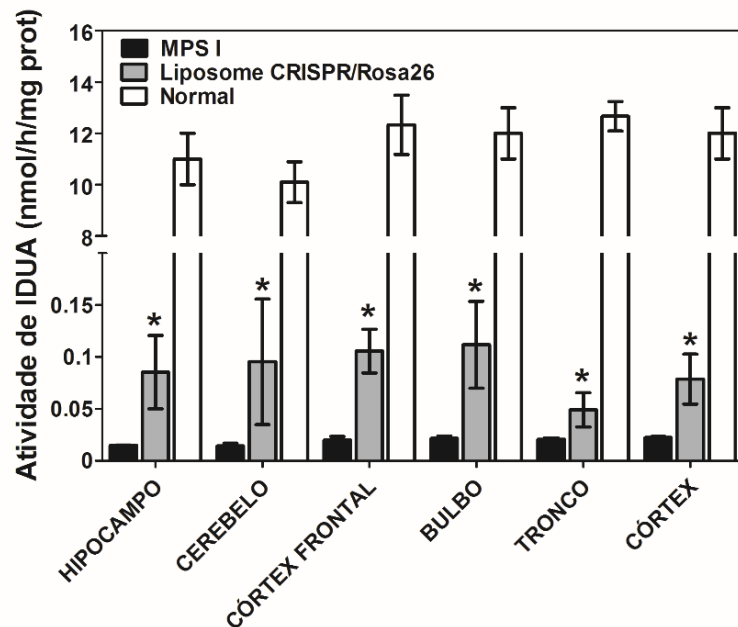


Figura 8. Atividade de IDUA no tecido cerebral de animais MPS I tratados por via nasal durante 30 dias com o complexo lipossomal. Anova, Tukey post-hoc, $p < 0.05$. MPS I = mucopolissacaridose tipo I. Liposome CRISPR/Rosa26 - animais tratados com lipossomas contendo as sequências para edição gênica.

Faz-se importante ressaltar que pacientes com a forma Scheie da doença possuem apenas uma atividade residual da enzima e não apresentam acometimento cerebral significativo (GIUGLIANI, 2012; NEUFELD; MUENZER, 2007; WRAITH; JONES, 2014). Isso nos leva a crer que, mesmo uma correção modesta deste órgão pode ser suficiente para prevenir o aparecimento dos sintomas neuronais, o que já foi demonstrado em experimentos envolvendo terapia gênica em modelo animal de MPS I (BALDO *et al.*, 2013).

Mais experimentos estendidos de administração nasal contemplando diversas análises como nível de GAGs na urina e tecidos, GFAP no córtex, comportamento, funções cardiovasculares e respiratórias, e análise óssea dos animais são pretensões para o pós-doutorado.

Existem diversos parâmetros que podem influenciar no sucesso da edição genômica com o sistema CRISPR/Cas9. Um deles é a eficiência de correção por recombinação homóloga que pode ser influenciada por muitos fatores, que estão associados principalmente ao desenho dos vetores. Em primeiro lugar, as alterações feitas na sequência do molde que não modificam suficientemente o local de reconhecimento e clivagem da Cas9 podem resultar em mutagênese adicional por UENH na mesma região, reduzindo as taxas de correção. O tamanho da região homóloga também pode ter influência, e quanto maior for esta região, maiores as chances de ocorrência de recombinação. Ainda, vetores doadores com fita simples também parecem ter mais sucesso de recombinação do que vetores com fita dupla de DNA, dependendo do tamanho da sequência a ser corrigida/inserida (CONG et al., 2013; YANG et al., 2017). Neste trabalho optamos pelo uso de uma sequência maior que está sendo utilizada para outros experimentos, o que justifica a presença de um gene de resistência à higromicina. No entanto, em um estudo visando uma aplicação clínica, um desenho mais simples deverá ser considerado, objetivando reduzir o tamanho do inserto e, dessa forma, otimizar o processo.

Outro fator importante a ser analisado e que pode estar relacionado a um possível prejuízo é a ocorrência de clivagens pela Cas9 fora do local de interesse (*off-target*) (FINE; CRADICK; BAO, 2014). Novamente visando uma aplicação clínica, é importante que se faça uma análise dos possíveis locais onde possam ocorrer clivagens *off-target*, para que não sejam modificadas indiretamente outras regiões importantes dentro do genoma (FINE; CRADICK; BAO, 2014). Existem ferramentas computacionais que fazem predição de possíveis sítios de clivagem *off-target* por meio do número e localização de *mismatches* entre a sequência do RNA guia e o genoma de referência. O próximo passo da análise seria a seleção das sequências com maior probabilidade de *off-target* e seu sequenciamento para verificar a frequência de ocorrência de clivagens nessas regiões. Caso recombinações *off-target* estejam ocorrendo em locais importantes do genoma,

algumas possíveis soluções são a diminuição da quantidade de vetor CRISPR/Cas9 utilizado na transfecção (o que poderia diminuir também a atividade da nuclease na sequência alvo) (RAN et al., 2013). Os experimentos para identificação de alvos *off-target*, quantificação e sequenciamento dessas regiões estão em andamento.

Como existe uma preocupação com a potencial de geração de mutagênese insercional a partir do uso deste sistema, estamos realizando um projeto paralelo que monitorará durante dois anos 15 animais normais tratados, comparando a 15 controles (animais sem tratamento). Análises bioquímicas e histológicas estão sendo realizadas para demonstrar a possibilidade de indução tumoral do tratamento, baseando-se em estudo similar que avaliou a capacidade de mutagênese insercional após terapia genica com retrovírus (TITTIGER et al., 2008). Até o momento não foram identificadas diferenças entre os animais normais (controle) e os tratados, sugerindo a segurança do tratamento até cerca de um ano após a injeção.

Ainda são poucos os estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* no campo da edição gênica com uso da ferramenta CRISPR/Cas9. Com a evolução rápida e o interesse crescente dos pesquisadores, essa tecnologia pode significar a cura de doenças para as quais só existem terapias crônicas e paliativas.

REFERÊNCIAS

ANGUELA, X. M. et al. Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. **Blood**, v. 122, n. 19, p. 3283–3287, 7 nov. 2013.

ARONOVICH, E. L. et al. Systemic correction of storage disease in MPS I NOD/SCID mice using the sleeping beauty transposon system. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 17, n. 7, p. 1136–44, 2009.

BALDO, G. et al. Retroviral Vector-mediated Gene Therapy to Mucopolysaccharidosis I Mice Improves Sensorimotor Impairments and Other Behavior Deficits. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 36, n. 3, p. 499–512, 15 maio 2013.

BALDO, G.; GIUGLIANI, R.; MATTE, U. Gene delivery strategies for the treatment of mucopolysaccharidoses. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 3, p. 449–459, 2014.

BIOULAC, P. et al. The diagnosis of mucopolysaccharidoses by electron microscopy of skin biopsies. **Journal of cutaneous pathology**, v. 2, n. 4, p. 179–190, 1975.

BONAMASSA, B.; HAI, L.; LIU, D. Hydrodynamic Gene Delivery and Its Applications in Pharmaceutical Research. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 4, p. 694–701, 2011.

BRADY, R. O.; YANG, C.; ZHUANG, Z. An innovative approach to the treatment of Gaucher disease and possibly other metabolic disorders of the brain. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 36, n. 3, p. 451–454, 2013.

CARVALHO, T. G. et al. Genome Editing: Potential Treatment for Lysosomal Storage Diseases. **Current Stem Cell Reports**, v. 1, n. 1, p. 9–15, 2015.

CHAN, C.-L. et al. Endosomal escape and transfection efficiency of PEGylated cationic liposome–DNA complexes prepared with an acid-labile PEG-lipid. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4928–4935, jun. 2012.

CONG, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013.

ESTEBE, J. P.; MALLEDANT, Y. Fat embolism after lipid emulsion infusion. **Lancet (London, England)**, v. 337, n. 8742, p. 673, mar. 1991.

FEIN, D. E. et al. Cationic Lipid Formulations Alter the In Vivo Tropism of AAV2/9 Vector in Lung. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 12, p. 2078–2087, 28 dez. 2009.

FENSKE, D. B.; CHONN, A.; CULLIS, P. R. Liposomal nanomedicines: an emerging field. **Toxicologic pathology**, v. 36, n. 1, p. 21–29, 2008.

FINE, E. J.; CRADICK, T. J.; BAO, G. Identification of off-target cleavage sites of zinc finger nucleases and TAL effector nucleases using predictive models. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1114, p. 371–383, 2014.

FRAGA, M. et al. PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect

pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 37–46, 2015a.

FRAGA, M. et al. Cationic Nanoemulsions as a Gene Delivery System: Proof of Concept in the Mucopolysaccharidosis I Murine Model. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 810–816, 2015b.

FRAGA, M. et al. PEGylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pIDUA in a mucopolysaccharidosis type I murine model. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 37–46, 2015c.

FRAGA, M. et al. Factors influencing transfection efficiency of pIDUA/nanoemulsion complexes in a mucopolysaccharidosis type I murine model. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 2061–2067, 2017.

GIUGLIANI, R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 924–931, 2012.

GIUGLIANI, R. et al. Emerging treatment options for the mucopolysaccharidoses. **Research and Reports in Endocrine Disorders**, v. 2, p. 53–64, 2012.

HARTUNG, S. D. et al. Enzymatic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts by adeno-associated virus-mediated transduction of the alpha-L-iduronidase gene. **Human gene therapy**, v. 10, n. 13, p. 2163–2172, set. 1999.

HULMAN, G. The pathogenesis of fat embolism. **The Journal of pathology**, v. 176, n. 1, p. 3–9, maio 1995.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 297–315, set. 2006.

KEELING, K. M. et al. Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 3, p. 291–299, fev. 2001.

LEKKA, M. E. et al. The Impact of Intravenous Fat Emulsion Administration in Acute Lung Injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 169, n. 5, p. 638–644, 1 mar. 2004.

LOVELYN, C.; ATTAMA, A. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5A, p. 626–639, 2011.

METCALF, J. A. et al. A Self-inactivating γ -Retroviral Vector Reduces Manifestations of Mucopolysaccharidosis I in Mice. **Molecular Therapy**, v. 18, n. 2, p. 334–342, 20 fev. 2010.

MILLER, M. A. et al. Visualization of Murine Intranasal Dosing Efficiency Using Luminescent *Francisella tularensis*: Effect of Instillation Volume and Form of

Anesthesia. **PLOS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31359, 24 fev. 2012.

NANCHI, I. et al. Exploring new gene integration sites for gene knock-in by gene-trapping strategy. **Transgenic research**, v. 24, n. 3, p. 549–559, jun. 2015.

NEUFELD, E. S.; MUENZER, J. The online metabolic and molecular basis of inherited disease. In: VALLE, D.; BEAUDET, A. L.; VOGELSTEIN, B. (Eds.). . New York: MacGrow Hill, 2007.

PRESTON, S. P.; PELLEGRINI, M.; EBERT, G. Hydrodynamic Injection as a Method of Gene Delivery in Mice: A Model of Chronic Hepatitis B Virus Infection. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1419, p. 109–115, 2016.

RAN, F. A. et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380–1389, set. 2013.

SCHUH, R.; BALDO, G.; TEIXEIRA, H. Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 12, p. 1709–1718, 2016.

SEBESTYEN, M. G. et al. Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. **The journal of gene medicine**, v. 8, n. 7, p. 852–873, 2006.

TITTIGER, M. et al. Neonatal intravenous injection of a gammaretroviral vector has a low incidence of tumor induction in mice. **Human gene therapy**, v. 19, n. 11, p. 1317–1323, nov. 2008.

WANG, H. et al. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 910–918, 2013.

WRAITH, J. E.; JONES, S. Mucopolysaccharidosis type I. **Pediatric endocrinology reviews : PER**, v. 12 Suppl 1, p. 102–106, set. 2014.

YAN, S. et al. High levels of gene expression in the hepatocytes of adult mice, neonatal mice and tree shrews via retro-orbital sinus hydrodynamic injections of naked plasmid DNA. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 3, p. 763–771, 2012.

YANG, H. et al. One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1370–1379, 11 out. 2017.

YU, B.; LEE, R. J.; LEE, L. J. Microfluidic Methods for Production of Liposomes. **Methods in enzymology**, v. 465, p. 129–141, 2009.

CONCLUSÃO

A principal conclusão deste trabalho se apoia na premissa de que é possível utilizar sistemas lipídicos nanoestruturados como vetores não-virais para edição gênica via CRISPR/Cas9 em um modelo de doença genética monogênica, a MPS I.

- Publicamos um artigo de revisão bibliográfica em que discutimos como a nanotecnologia pode ser utilizada no tratamento das MPS. Comentamos quais tipos de biomateriais e nanoestruturas podem ser utilizados, além de citar estudos atuais em que se utilizam ou se poderia fazer uso dessas nanoestruturas.

- Lipossomas e nanoemulsões foram produzidos e avaliados como co-carreadores do plasmídeo CRISPR/Cas9 e do oligonucleotídeo doador da *IDUA* e demonstraram ser estáveis e eficientes na liberação intracelular dos ácidos nucleicos.

- Fibroblastos de pacientes MPS I homocigotos para Trp402* foram transfectados com lipossomas e nanoemulsões complexados ao sistema CRISPR/Cas9 e ao oligonucleotídeo doador da sequência normal do gene *IDUA*. Os complexos promoveram aumento significativo da atividade de *IDUA* e normalização da morfologia dos lisossomos após os tratamentos.

- Nanoemulsões e lipossomas foram produzidos por microfluidização e caracterizados para verificar sua viabilidade como carreadores do sistema CRISPR/Cas9. Ambos provaram ser efetivos carreadores, sem influência quanto ao tipo ou tamanho da sequência dos ácidos nucleicos.

- Foi realizada injeção hidrodinâmica dos complexos lipossomais contendo os plasmídeos CRISPR/Cas9 e doador *Idua* ROSA26 em camundongos MPS I neonatos, e foi demonstrado aumento significativo da atividade enzimática e redução dos GAGs em diversos tecidos, gerando um depósito no INPI da produção intelectual derivada desse estudo.

- Os animais MPS I tratados com os complexos lipossomais demonstraram melhora nas funções pulmonar e cardiovascular, ossos, morfologia da face e aorta. Somente não houve melhora no comportamento e neuroinflamação.

- A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, verificou-se a possibilidade da administração nasal de carreadores para terapia gênica visando ao cérebro. Um experimento piloto foi realizado e então ocorreu o depósito da produção intelectual envolvida nos resultados dos estudos.

ANEXO 1

Patente de inovação depositada no INPI

Composição editora de genoma, processo de obtenção e uso da mesma



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 003860 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92969856000198

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AV. PAULO GAMA Nº 110, 6º ANDAR, CENTRO, PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90040-060

País: Brasil

Telefone: (51)3308.3800

Fax: (51)3308.4237

Email: sedetec@ufrgs.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÃO EDITORA DE GENOMA, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DA MESMA

Resumo: 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.

Figura a publicar: 2

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: ROSELENA SILVESTRI SCHUH

CPF: 00466421028

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Venâncio Aires, 3385. Bairro Niteroi

Cidade: Canoas

Estado: RS

CEP: 92110-001

País: BRASIL

Telefone: (51) 999 220792

Fax: (51) 330 85437

Email: roselena.schuh@ufrgs.br

Inventor 2 de 5

Nome: HELDER FERREIRA TEIXEIRA

CPF: 47307420015

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Loureiro da Silva, 1870 / apto. 1201. Bairro Cidade Baixa

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90050-240

País: BRASIL

Telefone: (51) 999 563207

Fax: (51) 330 85437

Email: helder.teixeira@ufrgs.br

Inventor 3 de 5

Nome: GUILHERME BALDO

CPF: 00370352076

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Professor Freitas Cabral, 370 / apto. 205. Bairro Jardim Botânico

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90690-130

País: BRASIL

Telefone: (51) 999 955677

Fax: (51) 335 98010

Email: gbaldo@hcpa.edu.br

Inventor 4 de 5

Nome: URSULA DA SILVEIRA MATTE

CPF: 67696201034

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Felipe de Oliveira, 921 / apto. 1002. Bairro Petrópolis

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90630-000

País: BRASIL

Telefone: (51) 999 747564

Fax: (51) 335 98010

Email: umatte@hcpa.edu.br

Inventor 5 de 5

Nome: TALITA GIACOMET DE CARVALHO

CPF: 05103409976

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Demétrio Ribeiro, 1030 / apto. 203. Bairro Centro Histórico

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90010-313

País: BRASIL

Telefone: (51) 991 273349

Fax: (51) 335 98010

Email: tgcarvalho@hcupa.edu.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	Relatório_Descritivo.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Resumo	Resumo.pdf
Desenho	Desenhos.pdf
GRU	GRU.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante de pagamento GRU.pdf
Port.7906/2016 DelegaçãoCompt	Port 7906 - Delegação de competência SEDETEC - José Luis Ribeiro.pdf
Termo Posse Prof.Rui Vicente	Termo de posse - Brasília - Prof. Rui Vicente Oppermann.pdf
Termo Condução Cargo Prof.Rui	Termo de condução de cargo - Prof. Rui Vicente Oppermann.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

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 genebased 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 nonviral 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 nãovirais 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 seqüências 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; Zimrnernan 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 contêm 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.v1286-00; Morrissey et al, Nature Biotechnology 2005, v. 23(8), p. 1002-07; Zimrnernnan 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.

[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.

(F) 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, RJ.; 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) 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.

[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 carreamento 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 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, DMPEPEG, 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, dimetildiocetadecilamônio (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 glicosíldiacilglicerois, 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).

[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

- 5% p/p Triglicerídeos de cadeia média
- 0,56% p/p DOPE
- 0,56% p/p DOTAP
- 0,285% p/p DSPE-PEG

[0108] Fase aquosa

- 2,25% p/p Glicerol
- 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

- d. 2,25% p/p Glicerol
- e. 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

- d. 1,0% p/p Polissorbato 80
- e. 2,25% p/p Glicerol
- f. 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 plasmídeo 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-Liduronídeo (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-metilumbeliferil-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, 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).

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.

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.

FIGURAS

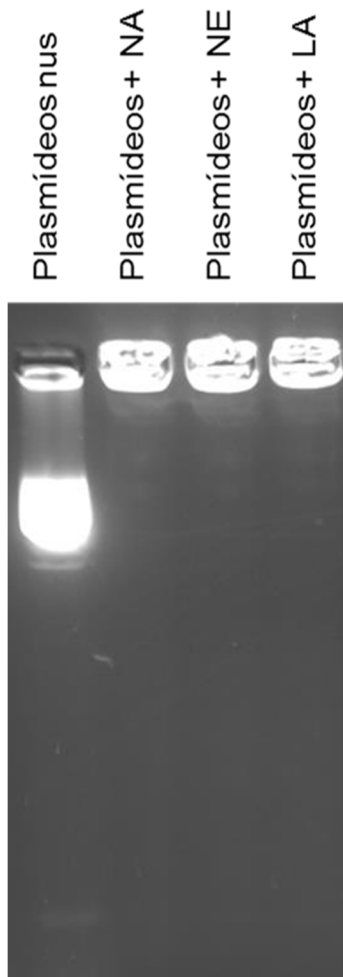


Figura 1

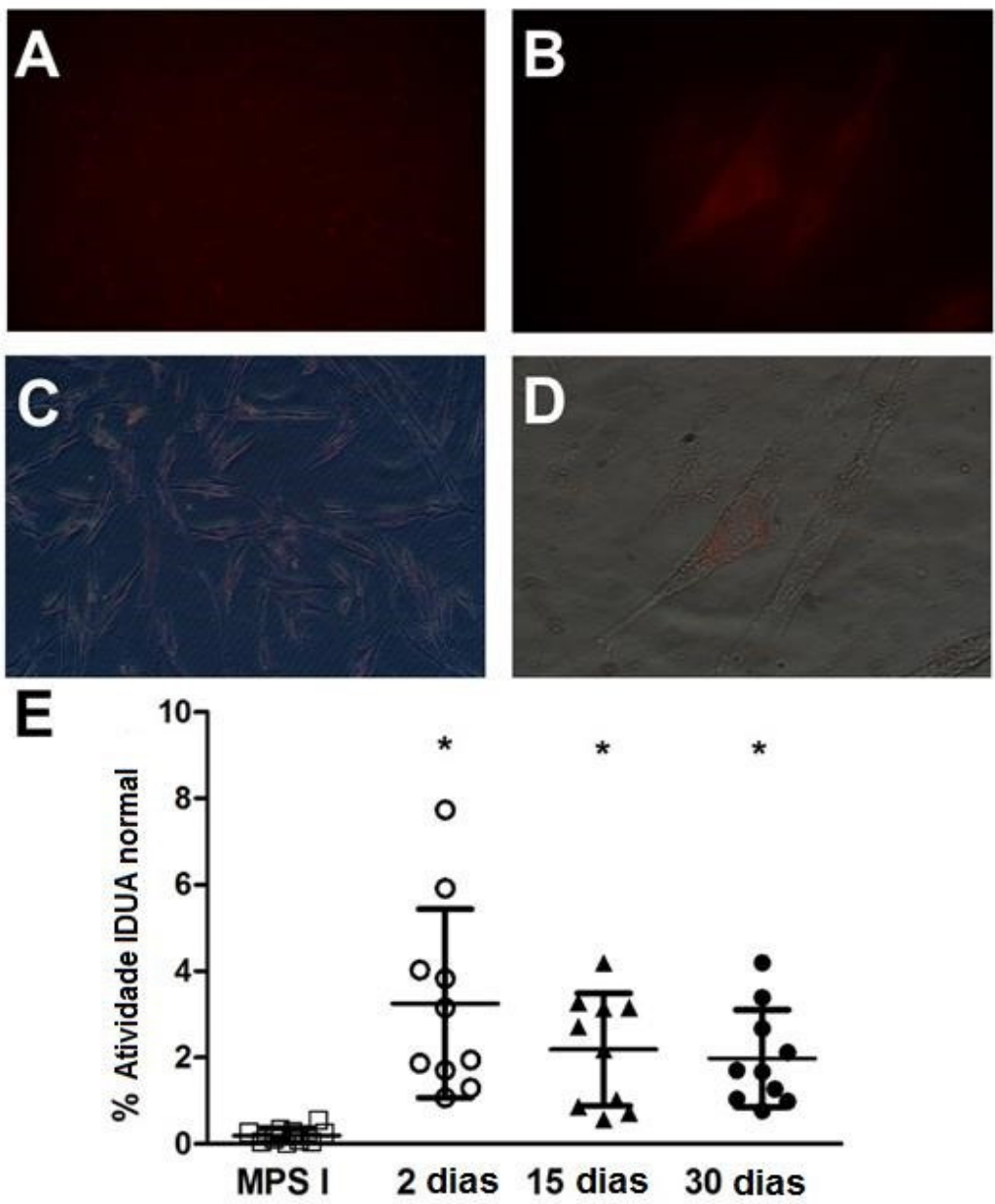


Figura 2

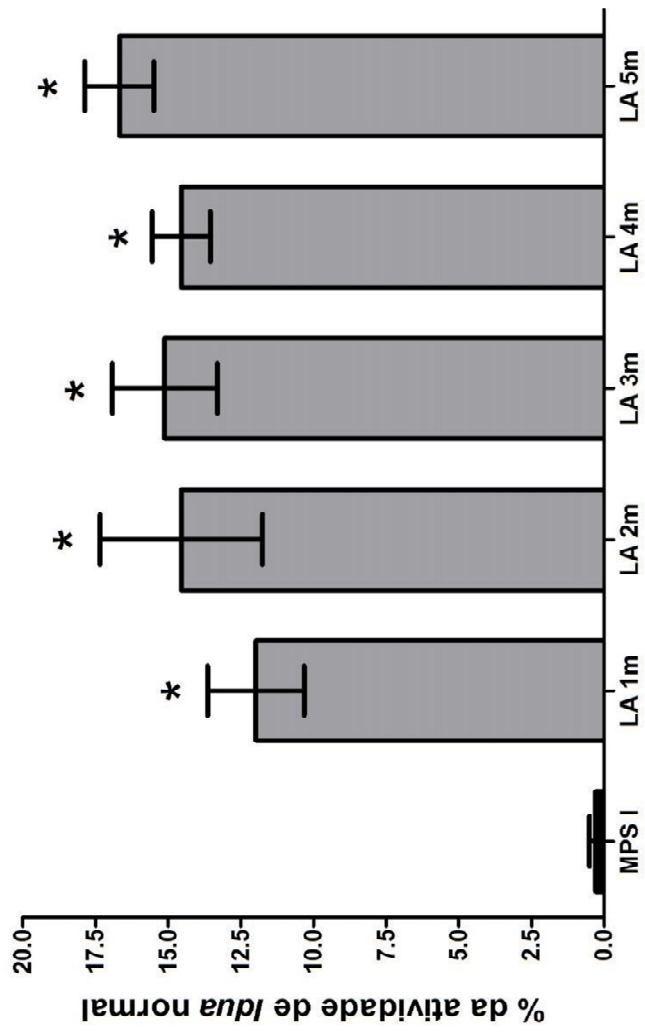


Figura 3



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

PORTARIA Nº 7906 de 05/10/2016

Delegação de competência ao Secretário de Desenvolvimento Tecnológico.

O REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto nos artigos 11 e 12 do Decreto-Lei nº 200, de 25 de fevereiro de 1967, regulamentado pelo Decreto nº 62.460, de 25 de março de 1968,

RESOLVE:

Artigo 1º - Delegar competência ao Professor **JOSÉ LUIS DUARTE RIBEIRO**, Secretário de Desenvolvimento Tecnológico, para, a partir de 30 de setembro de 2016 e sem prejuízo das atribuições que regimentalmente competem ao titular do mesmo cargo, praticar os atos administrativos a seguir enumerados:

1. Solicitação de registro da propriedade intelectual, junto aos órgãos competentes do país e do exterior, bem como instrumentos de licenciamento de tecnologia, sem exclusividade, a seguir relacionados:

1.1 - registro de patente (patentes de invenção, modelos de utilidade, desenho industrial, etc.);

1.2 - certificado de adição;

1.3 - registro de marca;

1.4 - transferência de titularidade;

1.5 - registro de software;

1.6 - registro e proteção de cultivares;

1.7 - petições para pagamento de anuidade, atendimento de exigências, exames de patentes, etc;

1.8 - demais documentos que tenham por objetivo solicitar registro de propriedade intelectual da UFRGS;

1.9 - contratos de licenciamento de propriedade intelectual da UFRGS, na forma não exclusiva para o licenciante, com prévia análise da Procuradoria Geral da UFRGS.

2. Instrumentos legais firmados com parceiros externos, que não envolvem recursos financeiros, apenas resguardam direitos de propriedade intelectual da instituição.

2.1 - contratos de Co-Titularidade - Estes instrumentos legais são Firmados com o objetivo de estabelecer os percentuais de co-titularidade e as obrigações de cada uma das partes, com relação ao uso e manutenção dos direitos de propriedade intelectual sobre uma tecnologia;

2.2 - acordos de Confidencialidade - Os Acordos de Confidencialidade têm por objetivo proteger a tecnologia, desenvolvida pelos pesquisadores da UFRGS, com vistas a possibilitar seu emprego no processo produtivo econômico por parte de algum parceiro externo;

2.3 - acordos de Transferência de Material Biológico - Estes Acordos visam assegurar os direitos das partes sobre os materiais biológicos de sua propriedade, na transferência, para fins de pesquisa, para uma instituição parceira.

3. Firmar documentos, na esfera de competência da Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico - SEDETEC, com parceiros externos onde não ocorram repasse de recursos financeiros, nem envolvam despesas para as partes.

3.1 - contratos onde, no objeto, estejam previstas atividades de P&D, com prévia análise legal pela Procuradoria Geral da UFRGS;

3.2 - termos de compromisso.

4. Firmar documentos onde exista repasse de recursos do exterior, voltados para P&D, mas que não gerem obrigações financeiras para a Instituição.

4.1 - auxílio de países desenvolvidos;

4.2 - doações oriundas do exterior;

4.3 - recursos de fundos perdidos.

Parágrafo único: A administração financeira destes recursos, ficará a cargo da PROPLAN/UFRGS.

Artigo 2º - As assinaturas de convênios não estão incluídas na delegação de competência constante no artigo anterior, permanecendo com a tramitação atual e firmada pelo Reitor.

Artigo 3º - A autoridade a que se refere o artigo 1º da presente Portaria, considerando a necessidade do serviço, poderá subdelegar os poderes que, por este ato, lhe são delegados.

Artigo 4º - Revogam-se as disposições em contrário.

RUI VICENTE OPPERMANN.



Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Av. Paulo Gama, 110 – 6º andar
90040-060 – Porto Alegre – RS
Fone: (51) 3308.3601, Fax: (51) 3308.3973

TERMO DE CONDUÇÃO DE CARGO

Às dez horas do dia vinte e nove de setembro do ano de dois mil e dezesseis, em Sessão Solene no Salão de Atos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o professor **RUI VICENTE OPPERMANN** é conduzido ao cargo de Reitor desta Universidade, para o qual foi nomeado com mandato de quatro anos, conforme Decreto Presidencial de 20 de setembro de 2016, publicado no Diário Oficial da União no dia 21 de setembro de 2016, seção 2, página 1, e no qual tomou posse em Brasília, no dia vinte e oito de setembro de dois mil e dezesseis, perante o Excelentíssimo Senhor Ministro da Educação, José Mendonça Bezerra Filho. Do que para constar, eu, Claudia Regina Mano, lavrei o presente termo, que vai assinado pelo Empossado e testemunhas.

Professor Rui Vicente Oppermann

Testemunhas:

Assinaturas manuscritas das testemunhas, incluindo uma assinatura com o nome "VELLA" visível.

ANEXO 2

Patente de inovação depositada no INPI

**Composição para terapia gênica do sistema nervoso central, processo de
obtenção e uso da mesma**



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 016440 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92969856000198

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AV. PAULO GAMA Nº 110, 6º ANDAR, CENTRO, PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90040-060

País: Brasil

Telefone: (51)3308.3800

Fax: (51)3308.4237

Email: propriedadeintelectual@ufrgs.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

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

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

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 6

Nome: ROSELENA SILVESTRI SCHUH

CPF: 00466421028

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Venâncio Aires, 3385

Cidade: Canoas

Estado: RS

CEP: 92110-001

País: BRASIL

Telefone: Fax:

Email: roselena.schuh@ufrgs.br

Inventor 2 de 6

Nome: HELDER FERREIRA TEIXEIRA

CPF: 47307420015

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Loureiro da Silva, 1870 / apto. 1201

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90050-240

País: BRASIL

Telefone: Fax:

Email: helder.teixeira@ufrgs.br

Inventor 3 de 6

Nome: GUILHERME BALDO

CPF: 00370352076

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Professor Freitas Cabral, 370 / apto. 205

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90690-130

País: BRASIL

Telefone: Fax:

Email: gbaldo@hcpa.edu.br

Inventor 4 de 6

Nome: URSULA DA SILVEIRA MATTE

CPF: 67696201034

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Felipe de Oliveira, 921 / apto. 1002

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90630-000

País: BRASIL

Telefone: Fax:

Email: umatte@hcpa.edu.br

Inventor 5 de 6

Nome: ROBERTO GIUGLIANI

CPF: 12155438087

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Coronel Corte Real, 311/802

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90630-080

País: BRASIL

Telefone: Fax:

Email: rgiugliani@hcpa.edu.br

Inventor 6 de 6

Nome: JULIANA BIDONE

CPF: 00733988962

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Marechal Deodoro, 1173 apto 202

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 96020-220

País: BRASIL

Telefone: Fax:

Email: julianabidone@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU	GRU - Comprovante de pagamento.pdf
Rel Desc	Relatório Descritivo
Reivindicações_	Reivindicação
Resumo_	Resumo
Figuras	Desenho
Portaria	PORTARIA + DOU.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Relatório descritivo de patente de invenção

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

Campo da invenção

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

Antecedentes da invenção

[0002] Deficiências e/ou anomalias genéticas (mutação, expressão aberrante, etc) estão envolvidas na origem de numerosas doenças, de caráter hereditário ou não. A medicina convencional é limitada para tratar essas doenças, utilizando-se de terapias para amenização dos sintomas. Mais recentemente, surgiu a terapia gênica, que consiste na inserção de um gene funcional a fim de corrigir uma disfunção celular ou prover novas funções à célula, com a introdução do material genético diretamente nas células do paciente (*in vivo*), ou a partir da administração das células após modificação *in vitro* (*ex vivo*). A terapia gênica é definida como a modificação genética de células com a intenção de alterar a expressão de algum gene para prevenir, impedir ou reverter um processo patológico (KAY, M. A. State-of-the-art genebased 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 polianiônico, à possibilidade de interação e agregação com proteínas, e à ocorrência de degradação enzimática (LIU, C.-H.; YU, S.-Y. Cationic nanoemulsions as nonviral 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 nãovirais mais descritos. Os lipossomas podem ser definidos como dispersões aquosas de uma mistura de fosfolipídios, organizadas na forma de bicamadas e com um núcleo aquoso central. Já as nanoemulsões, as nanopartículas lipídicas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados, organizam-se como monocamadas com um núcleo lipídico respectivamente líquido, sólido, ou ambos, dispersas em uma fase aquosa (geralmente do tipo O/A), e estabilizadas por um filme interfacial constituído por emulsificantes fosfolipídicos (SCHUH, R. S.; BRUXEL, F.; TEIXEIRA, H. F.

Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. *Química Nova* 2014, v. 37, p. 1193–1198).

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

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

[0008] As possibilidades de tratamento de doenças geradas pela terapia gênica são inúmeras, e seu carreamento através de vetores não-virais aumenta muito as chances de sucesso, porém a chegada dessas composições no sistema nervoso central continua sendo um desafio. O cérebro é um órgão exclusivamente protegido que reside dentro dos limites ósseos do crânio, tornando difícil seu alcance através da entrega sistêmica de medicamentos. Uma variedade de obstáculos protege o

sistema nervoso central e ao mesmo tempo impede a chegada de medicamentos ao cérebro e medula espinhal e incluem a barreira hemato encefálica (BHE) e a barreira do líquido cefalorraquidiano (BLCR). As barreiras sangue-cérebro restringem a difusão passiva de macromoléculas ao cérebro e constituem um obstáculo significativo ao cérebro / sistema nervoso central (SNC) no tratamento farmacológico de doenças genéticas com acometimento neurológico, e entre elas estão as doenças lisossômicas de depósito (Saraiva, C. et al. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, 2016, v. 235, p. 34-47).

[0009] Métodos invasivos de tratamento do SNC incluem a administração intracraniana direta de fármacos por administração intracerebroventricular, intracerebral ou intratecal, e criam buracos na cabeça que interrompem a integridade da barreira hematoencefálica pela ruptura osmótica da barreira cerebral do sangue.

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

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

[0012] As tecnologias protegidas pelos números WO 2015089419 (A2) 18/06/2015, e WO2014093622 (A2) 19/06/2014, descrevem a utilização de partículas para entrega do sistema CRISPR/Cas. Os lipossomas das tecnologias protegidas são produzidos por um método de extrusão através de membrana ou formação espontânea pela hidratação do filme lipídico (Coelho et al, *N Engl J Med* 2013, v. 369, p. 819-29; Basha et al, *Molecular Therapy* 2011, v. 19(12), p. 1286-00; Morrissey et al, *Nature Biotechnology* 2005, v. 23(8), p. 1002-07; Zimmermann 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. 852933; U.S. Pat. Nos. 5593972, 5589466 e 5580859). A tecnologia protegida também cita nanoplexos (Bartlett et al, *PNAS* 2007, v. 104(39), p. 15549-54) e um sistema de entrega baseado em nanopartículas (Davis et al, *Nature* 2010, v. 464(15), p. 1067-70), que utilizam ciclodextrinas em sua composição,

diferindo da presente invenção. As nanopartículas citadas contém polímeros, diferindo da presente invenção.

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

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

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

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

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

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

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

[0020] A tecnologia protegida sob o número WO 200641942 (A2) descreve uma composição que pode ser utilizada como implante biodegradável.

[0021] A tecnologia WO2016174250 (A1) refere-se a nanocarreadores com ligantes de ancoragem para entregar uma ferramenta para a transferência gênica a células.

As âncoras possuem uma porção de direcionamento que pode ser um carboidrato, um anticorpo ou um fragmento de anticorpo, uma proteína, um aptâmero, entre outros.

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

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

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

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

Sumário da Invenção

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

[0027] A tecnologia descrita no presente invento fornece novas composições e métodos para tratar síndromes que acometem principalmente o sistema nervoso central. Em algumas formas de realização da seguinte invenção, ela pode ser administrada desde uma vez ao dia até diversas vezes ao dia durante vários dias.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- (b) dissolver, de 1,0% p/p a 5% p/p de tensoativo e de 0,1% p/p a 5,0% p/p de um agente de tonicidade em uma solução aquosa, com temperatura de 30° C a 80° C;
- (c) adicionar a solução aquosa da etapa (A) na solução oleosa da etapa (B), sob agitação e com temperatura de 30° C a 80° C;
- (d) agitar o produto obtido em (C) em dispersor ultra-turrax, a uma velocidade entre 500 e 25000 rpm, sob aquecimento de 30° C a 80° C, durante 30 segundos a 10 minutos; e
- (e) homogeneizar a formulação obtida em (D) em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada;
- (f) ácidos nucleicos para proporções entre +2/-1 e +10/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO); e
- (g) adicionar uma solução de polications com concentração de 0,001 mg/mL a 10 mg/mL.

[0034] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso da composição para terapia gênica do sistema nervoso central no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por deficiências ou anomalias genéticas como as doenças lisossômicas de depósito.

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

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

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

Breve descrição das figuras

[0038] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras: **[0039]** A figura 1 demonstra a co-complexação das formulações com um plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 e um plasmídeo doador da sequência da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA) utilizado para reparação do genoma por recombinação homóloga após clivagem pela Cas9,

direcionado ao locus Rosa 26 de camundongos. Podem ser observadas bandas dos plasmídeos nus, e pode-se observar que as formulações nanoemulsão com ácidos nucleicos adsorvidos (NA), nanoemulsão com ácidos nucleicos encapsulados (NE) e lipossomas com ácidos nucleicos adsorvidos (LA) complexaram os plasmídeos que não migraram no gel, demonstrando 100% de complexação pois permaneceram no ponto de aplicação. A taxa de 100% foi calculada através do software ImageJ®.

[0040] A figura 2 mostra os valores de atividade enzimática de IDUA murina encontrada no soro de camundongos MPS I não tratados, e em camundongos MPS I tratados com o complexo LA CRISPR/pROSA26 ou com os plasmídeos CRISPR/pROSA26 nus, por via nasal durante 15 dias. Valores relativos à atividade enzimática de camundongos normais.

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

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

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

Descrição detalhada da invenção

[0044] A terapia gênica permite a um organismo produzir uma proteína deficiente que é essencial para seu funcionamento adequado através da administração de sequências de ácidos nucleicos que codificam para a proteína em questão. Para tal feito pode-se utilizar um plasmídeo recombinante que possua a sequência correta da proteína anormal e seja capaz de superexpressá-la ou ainda pode-se lançar mão das tecnologias de edição gênica. Em concretizações preferenciais, o plasmídeo recombinante está complexado a um carreador que será administrado pela via nasal.

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

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

[0047] O ácido nucleico a ser entregue pode ser o DNA de um vetor plasmideal, o RNA mensageiro (mRNA) ou o gRNA que codifica uma enzima ou faz parte da enzima que atuará clivando o material genético alvo, ou ainda pode ser uma sequência modelo utilizada para reparação do genoma alvo por recombinação homóloga. Onde o alvo no genoma inclui qualquer sequência que possa ser modificada para promover o silenciamento, a expressão ou superexpressão de proteínas. Em concretizações preferenciais, o ácido nucleico estará complexado a um carreador lipídico que será administrado pela via nasal.

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

[0049] Entretanto, algumas doenças possuem acometimento do SNC e necessitam da chegada do tratamento ao cérebro. Para a administração dos vetores não-virais contendo um plasmídeo recombinante ou o sistema CRISPR/Cas9 visando à terapia gênica de doenças com acometimento do SNC, sugere-se a via nasal, que é uma região altamente vascularizada, de fácil acesso e não invasiva. Além de ser uma via avaliada para absorção sistêmica, mais recentemente tem sido estudada como via de passagem direta de moléculas ao cérebro (GHORI, M. U. et al. Nasal Drug Delivery Systems: An Overview. *American Journal of Pharmacological Sciences*, v. 3, n. 5, p. 110– 119, 18 dez. 2015.). Existem diversos relatos da satisfatória passagem de macromoléculas através da barreira hematoencefálica após administração nasal. Esta rota envolve o sistema olfatório que inicia no cérebro e termina na cavidade nasal, no epitélio respiratório, sendo a única região do sistema nervoso central considerada de fácil acesso (LOCHHEAD, J. J.; THORNE, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced drug delivery reviews*, v. 64, n. 7, p. 614–628, maio 2012.).

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

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

[0052] Face ao exposto, considerando a baixa penetrabilidade intracelular dos ácidos nucleicos nus, juntamente com as vantagens do uso de sistemas nanométricos no carreamento e administração de ácidos nucleicos, juntamente com as potencialidades biológicas da administração desses complexos, a presente

invenção refere-se a formulações aquosas compreendendo ao menos um ácido nucleico complexado a carreadores não virais de diâmetro médio de gotícula/partícula inferior a 1,0 micrômetro. Os nanocarreadores da presente invenção compreendem nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.

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

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

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

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

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

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

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

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

- (b) dissolver entre 0,1% p/p a 5,0% p/p de agente de tonicidade em uma solução aquosa;
- (c) evaporar a solução orgânica obtida na etapa (a), para formar um filme;
- (d) adicionar a solução aquosa obtida na etapa (b) ao filme lipídico obtido na etapa (c);
- (e) deixar descansar o produto obtido na etapa (d) por 4 a 72 horas em uma temperatura entre 2°C e 20°C;
- (f) sonicar a formulação obtida na etapa (e) por 1 a 60 minutos a uma temperatura entre 25°C e 50°C;
- (g) homogeneizar a formulação obtida na etapa (f) em um homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada; e
- (h) adicionar uma solução de polications com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL.

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

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

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

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

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

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

- (i) dissolver de 0,1% p/p a 5,0% p/p de lipídeo catiônico e ácidos nucleicos em uma mistura monofásica de solventes apolar:prótico:prótico (1:2,1:1) por 30 minutos;
- (ii) adicionar ao produto obtido na etapa (i) 2 mL de solvente apolar e 2 mL de solvente prótico;
- (iii) agitar o produto obtido na etapa (ii) brevemente em vórtex;

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

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

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

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

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

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

(E) homogeneizar a formulação obtida em (D) em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada; e (F) adicionar uma solução de polications com concentração de 0,001mg/mL a 10mg/mL.

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

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

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

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

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

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

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

d) lipídeos neutros;

e) lipídeos catiônicos; e

f) lipídios com ramificação de PEG (peguilados).

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

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

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

fase lipídica:

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

fase aquosa:

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

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

fase lipídica:

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

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

fase aquosa:

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

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

fase lipídica:

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

fase aquosa:

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

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

fase lipídica:

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

fase aquosa:

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

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

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

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

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

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

[0081] A presente invenção apresenta como vantagens uma maior penetrabilidade intracelular devido ao uso de sistemas nanométricos no carregamento e administração de ácidos nucleicos possibilitando a produção de uma proteína deficiente, através do uso de nucleases combinado a ácidos nucleicos guia e ácidos nucleicos contendo a sequência parcial ou inteira de um gene, ou ainda de um plasmídeo recombinante contendo a sequência inteira de um gene. Também é uma vantagem a possibilidade de tratamento de doenças que possam ser causadas por problemas genômicos utilizando os produtos da presente invenção.

Exemplos - concretizações

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

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

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

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

[0086] No sentido da invenção, entende-se por gene terapêutico notadamente qualquer gene codificando para um produto proteico tendo um efeito terapêutico. O produto proteico assim codificado pode ser uma proteína, um peptídeo, etc. Este produto proteico pode ser homólogo com relação à célula alvo (isto é, um produto que é normalmente expresso na célula alvo, quando esta não apresenta nenhuma patologia). Nesse caso, a expressão de uma proteína permite por exemplo paliar uma expressão insuficiente na célula, ou a expressão de uma proteína inativa ou fracamente ativa em razão de uma modificação, ou ainda superexpressar a referida proteína. O gene terapêutico pode ainda codificar para uma proteína celular mutante, tendo uma estabilidade aumentada, uma atividade modificada, etc. O produto proteico pode igualmente ser heterólogo com relação à célula alvo. Neste caso, uma proteína expressada pode por exemplo completar ou promover uma atividade deficiente para a célula, permitindo-lhe lutar contra uma patologia, ou estimular uma resposta imune.

Fase lipídica

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

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

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

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

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

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

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

[0094] Com maior preferência, as composições da invenção compreendem, ainda, um ou vários lipídeos neutros. A requerente prevê que a adição de um lipídio neutro permite melhorar a formação das partículas lipídicas e, de maneira surpreendente, favorecer a penetração da partícula na célula, desestabilizando sua membrana. De maneira particularmente vantajosa, utilizam-se lipídios naturais ou sintéticos, zwitteriônicos ou desprovidos de carga iônica nas condições fisiológicas. Eles podem ser escolhidos mais particularmente entre a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), a oleilpalmitoilfosfatidiletanolamina (POPE), a di-estearoil, - palmitoil, -miristoil fosfatidileta-5 nolamina, assim como seus derivados N-metilados 1 a 3 vezes; os fosfatidilglicerois, os diacilglicerois, os glicosídiacilglicerois, os cerebrosídeos (tais

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

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

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

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

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

[0099] Em uma realização preferencial as nanopartículas lipídicas sólidas descritas na presente invenção compreendem o uso de monoestearato de glicerila (2,0% p/p a 10,0% p/p).

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

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

Tensoativos hidrofílicos

[0102] Os tensoativos hidrofílicos adequados para o uso na presente invenção incluem os surfactantes aniônicos, não aniônicos, catiônicos e anfóteros. Preferencialmente, os surfactantes da presente invenção podem ser escolhidos de grupo que compreende, sem, contudo, limitar, surfactantes não iônicos como polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 80, monoestearato de sorbitano 20, monoestearato de sorbitano 40, monoestearato de sorbitano 60, monoestearato de

sorbitano 80, emulsificantes colato de sódio, deoxicolato de sódio, glicolato de sódio, poloxâmeros, taurocolato de sódio, taureodexicolato de sódio, e/ou mistura destes.

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

Policátions

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

[0105] Em uma realização preferencial as formulações descritas na presente invenção compreendem o uso de quitosana (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

Solventes orgânicos

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

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

Obtenção das nanoestruturas lipídicas

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

- a) dissolver de 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica em uma solução orgânica composta por um solvente orgânico apolar;
- b) dissolver de 0,1% p/p a 5,0% p/p de agente de tonicidade em uma solução aquosa;
- c) evaporar todo o solvente orgânico do produto obtido na etapa a, obtendo assim um filme lipídico;
- d) adicionar a solução aquosa ao filme lipídico e deixar por 4 a 72 horas em 2°C a 20°C;
- e) sonicar a formulação por 1 a 60 minutos a uma temperatura entre 25°C e 50°C;
- f) homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada;
- g) adicionar policátions não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

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

- a) dissolver de 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica em uma solução orgânica composta por um solvente orgânico apolar;
- b) dissolver de 0,1% p/p a 5,0% p/p de agente de tonicidade em uma solução aquosa;
- c) evaporar todo o solvente orgânico do produto obtido na etapa a;
- d) adicionar a solução aquosa ao filme lipídico e deixar por 4 a 72 horas em 2°C a 20°C;
- e) sonicar a formulação por 1 a 60 minutos a uma temperatura entre 25°C e 50°C;
- f) homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada;
- g) extrusar a formulação em ao menos uma membrana com poro de 1000 nm a 220 nm e em ao menos uma membrana de 220 nm a 50 nm.
- h) adicionar polications não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

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

- a) dissolver de 0,1% p/p a 5,0% p/p de lipídeo catiônico juntamente com os ácidos nucleicos em uma mistura monofásica de solventes apolar: prótico: prótico (1:2,1:1) por 30 minutos;
- b) separar a monofase num sistema de duas fases pela adição de um solve apolar e um prótico (2 mL cada), seguido por vórtex breve. As fases polar e apolar são separadas por centrifugação a uma pressão entre 1000 e 4000 x g durante 2 a 30 min em temperatura entre 15°C e 35°C;
- c) adicionar de 2,0% p/p a 20,0% p/p de fase lipídica à fase orgânica do pré-complexo;
- d) dissolver de 0,1% p/p a 5,0% p/p de agente de tonicidade em uma solução aquosa;
- e) evaporar o solvente orgânico para formar um filme;
- f) adicionar a fase aquosa;
- g) deixar por 4 a 72 horas em 2°C a 20°C;
- h) sonicar por 1 a 60 minutos a uma temperatura entre 25°C e 50°C;
- i) homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada;

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

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

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

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

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

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

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

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

Formulações compreendendo os carreadores lipídicos

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

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

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

Especificação das nanopartículas lipídicas

[0115] A formação de nanopartículas foi primeiramente confirmada pela evidência de caráter homogêneo (sem separação de fases) e pela não ocorrência de precipitados. A seguir, as formulações foram especificadas de acordo com o diâmetro médio de gotícula/vesícula, índice de polidispersão, potencial zeta, e capacidade de complexação com os ácidos nucleicos.

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

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

Determinação do potencial zeta

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

Taxa de complexação com os ácidos nucleicos

[0119] A complexação dos ácidos nucleicos com as formulações foi verificada através de eletroforese em gel de agarose. Os complexos foram avaliados na relação de cargas +4/ -1 (cargas do lipídio catiônico/cargas dos ácidos nucleicos) e foram sujeitos à eletroforese em gel de agarose 1 % corados com o corante SYBR® 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:

[0120] Fase lipídica

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

[0121] Fase aquosa

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

Procedimento:

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

Produto obtido: Nanoemulsão (NA).

Resultados:

- Tamanho: 163 nm
- IPD: 0,14
- Potencial zeta: +47,1 mV
- Taxa de complexação: 100%. Ver figura 1.

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

Composição:

[0123] Fase lipídica

- 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

[0124] Fase aquosa

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

Procedimento:

[0125] Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados. O complexo hidrofóbico DNA/DOTAP foi preparado através da incubação dos ácidos nucleicos com o lipídio catiônico DOTAP numa mistura monofásica de

clorofórmio:metanol:água (1:2,1:1) em temperatura ambiente durante 30 min. A monofase foi, então, dividida em duas fases pela adição de clorofórmio e água (2 mL de cada), seguido por vórtex breve. As fases aquosa superior e orgânica inferior foram separadas por centrifugação a 2000 x g durante 10 min em temperatura ambiente. Na fase orgânica, então, os demais lipídios foram dissolvidos. Os componentes da fase aquosa foram pesados e dissolvidos em água purificada, sob agitação constante. A fase orgânica foi rota evaporada a pressão normal em temperatura ambiente, para eliminação do solvente orgânico e até a secura total, para formação do filme lipídico. Ao final do processo, a fase aquosa foi vertida sobre o filme lipídico, que é mantido a 4°C durante 12 horas. Após, a formulação foi sonicada a 37°C durante 15 minutos. Após, então, a formulação foi homogeneizada em homogeneizador a alta pressão por 10 ciclos de 500 bar cada, a fim de manter o diâmetro de gotícula da fase oleosa o menor possível e com menor índice de polidispersão. Por fim a solução de quitosana foi adicionada à formulação.

Produto obtido: Nanoemulsão (NE).

Resultados:

- Tamanho: 163 nm
- IPD: 0,14
- Potencial zeta: +48,7 mV
- Taxa de complexação: 100%. Ver figura 1.

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

Composição:

[0126] Fase lipídica

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

[0127] Fase aquosa

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

Procedimento:

[0128] Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados e dissolvidos em clorofórmio, com agitação constante. Os componentes da fase aquosa foram

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

Produto obtido: Lipossoma (LA).

Resultados:

- Tamanho: 108 nm
- IPD: 0,17
- Potencial zeta: +38,7 mV
- Taxa de complexação: 100%. Ver figura 1.

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

Composição:

[0129] Fase orgânica

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

[0130] Fase aquosa

- c. 1,0% p/p Polissorbato 80
- d. 2,25% p/p Glicerol
- e. ácidos nucleicos para a proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO)
- f. 0,005mg/mL p/v quitosana.

Procedimento:

[0131] Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados e fundidos a uma temperatura de 80° C, sob agitação constante. Os componentes da fase aquosa foram pesados e dissolvidos em um volume final de 100 mL de água purificada, sob agitação constante a uma temperatura de 80° C. A fase aquosa foi vertida sobre a fase lipídica, mantendo-se a temperatura em 80° C e com agitação constante durante 15 minutos. A formulação foi misturada em ultra-turrax durante 1 minuto, a uma

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

Produto obtido: Nanopartícula lipídica sólida.

Resultados:

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

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

Composição:

[0132] Fase orgânica

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

[0133] Fase aquosa

- d. 1,0% p/p polissorbato 8º
- e. 2,25% p/p glicerol
- f. ácidos nucleicos para proporção +4/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO)
- g. 0,05mg/mL p/v quitosana.

Procedimento:

[0134] Primeiramente, os componentes da fase lipídica foram pesados e fundidos a uma temperatura de 80° C, sob agitação constante. Os componentes da fase aquosa foram pesados e dissolvidos para um volume final de 100 mL de água purificada, com agitação constante a uma temperatura de 80° C. A fase aquosa foi vertida sobre a fase lipídica, mantendo-se a temperatura a 80° C e com agitação constante durante 15 minutos. A formulação foi misturada em ultra-turrax durante 1 minuto, a uma velocidade de 13.500 rpm e temperatura de 80° C. Ao final do processo, a formulação foi então homogeneizada a quente em homogeneizador a alta pressão com 10 ciclos de 750 bar cada, a fim de manter os diâmetros de partícula da fase oleosa o menor

possível e com menor índice de polidispersão. O produto foi deixado em repouso a uma temperatura ambiente por no mínimo 10 minutos. Por fim a quitosana foi adicionada.

Produto obtido: Carreador lipídico nanoestruturado.

Resultados:

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

Administração nasal

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

[0136] Para a entrega dos carreadores lipídicos contendo ao menos um ácido nucleico para fins de terapia gênica do sistema nervoso central, a invenção prioriza o uso da via nasal. Muitos fármacos potenciais para o tratamento de doenças neurológicas são incapazes de atingir o cérebro em concentrações suficientes para serem terapêuticas devido à barreira hematoencefálica. Por outro lado, a administração direta de fármacos ao cérebro proporciona a possibilidade de uma maior efetividade terapêutica do que com a administração sistêmica de um fármaco, exatamente por contornar a barreira hematoencefálica e por proporcionar o transporte de moléculas de alto peso molecular. A utilização da administração nasal de agentes terapêuticos ao cérebro proporciona um meio de contornar a barreira hematoencefálica de uma forma não invasiva. Nesse contexto, mostrou-se que os transportadores de fármaco nanométricos melhoram a administração de fármacos ao sistema nervoso central em comparação com soluções de fármaco equivalentes. As condições neurológicas que poderiam se beneficiar da administração nasal para entrega no cérebro incluem dor, epilepsia, doenças neurodegenerativas e doenças infecciosas (WY, O. et al, Nose-to-brain drug delivery by nanoparticles in the treatment of neurological disorders, Curr Med Chem, 2014, 21(37), p. 4247-56).

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

Ensaio *in vivo* em modelo murino de MPS I

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

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

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

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

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

[0141] Já para os experimentos de terapia gênica do sistema nervoso central com plasmídeo recombinante, foi utilizado um plasmídeo (pIDUA) contendo o cDNA da *IDUA* construído usando o vetor de expressão comercial pREP9 (Invitrogen, USA)

como descrito por Camassola e colaboradores (M. Camassola, L.M. Braga, A. Delgado-Cañedo, T.P. Dalberto, U. Matte, M. Burin, R. Giugliani, N.B. Nardi, Nonviral in vivo gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model, J. Inherit. Metab. Dis. 28 (2005) 1035– 1043).

Tratamentos

[0142] Um grupo (n=5) foi utilizado para a administração dos complexos lipossomais contendo o plasmídeo CRISPR/Cas9 e o plasmídeo *Idua/Rosa26* (LA) e este recebeu por via nasal o complexo LA em 30 aplicações de 120µL. Como controles foram utilizados camundongos normais que não receberam nenhum tratamento (n=3) e camundongos MPS I que não receberam nenhum tratamento (n=3). Para a administração nasal, os animais são imobilizados pelo pesquisador e são instiladas seis doses de 10µL em cada narina, a cada 15 minutos, uma vez por dia, durante 30 dias.

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

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

[0145] A figura 5 mostra os valores de atividade enzimática de IDUA encontrada em diferentes órgãos e mais precisamente no cérebro de camundongos MPS I não tratados e em camundongos MPS I tratados com o complexo NA/pIDUA por via nasal em uma aplicação. Valores relativos à atividade enzimática de camundongos normais.

Equivalentes

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

REIVINDICAÇÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(E) homogeneizar a formulação obtida em (D) em homogeneizador à alta pressão ou microfluidizador, por 2 a 20 ciclos de 250 a 2000 bar cada; e (F) adicionar polications não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

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

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

12. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com as reivindicações 5 a 9 **caracterizado pela** fase lipídica ser escolhida do grupo que consiste em:

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

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

- c) tensoativos lipofílicos tais como lecitinas e fosfolípídeos e/ou mistura dos mesmos;
- d) lipídeos neutros;
- e) lipídeos catiônicos; e
- f) lipídios com ramificação de PEG (peguilados).

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

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

fase lipídica:

- DOPE (0,5% p/p a 5,0% p/p);
- DOTAP (0,5% p/p a 5,0% p/p);
- DSPE-PEG (0,25% p/p a 5,0% p/p); fase aquosa:
- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p);
- Ácidos nucleicos para a proporção entre +2/-1 e +8/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO);
- Solução de policátions não-lipídicos (0,001mg/mL p/v a 10mg/mL p/v).

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

fase lipídica:

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

fase aquosa:

- Glicerol (0,1% p/p e 5,0% p/p)
- Ácidos nucleicos para a proporção entre +2/-1 e +8/-1 (DOTAP/ÁCIDO NUCLEICO);

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

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

fase lipídica:

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

fase aquosa:

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

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

fase lipídica:

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

fase aquosa:

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

18. Processo de obtenção de composição para terapia gênica do sistema nervoso central, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 13, **caracterizado** pela adição de uma solução de policátions não-lipídicos na concentração de 0,001mg/mL (p/v) a 10mg/mL (p/v), que compreende a quitosana, brometo de hexadimetrina ou outro sal, poli-L-lisina, polialilamina, polietileneimina,

entre outros, e/ou mistura destes. A adição destes pode ser realizada antes ou após a formação das nanoestruturas lipídicas ou dos complexos com os ácidos nucleicos.

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

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

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

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

RESUMO

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

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

FIGURAS

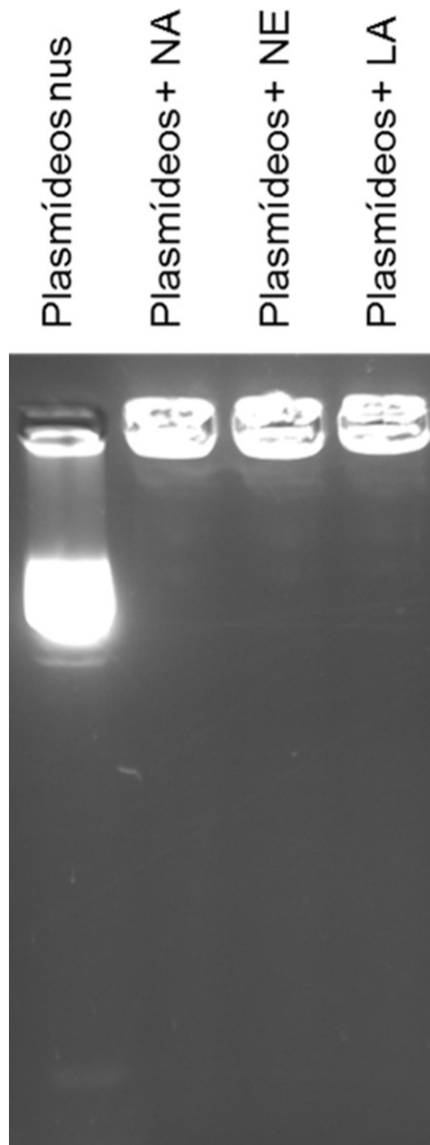


Figura 1

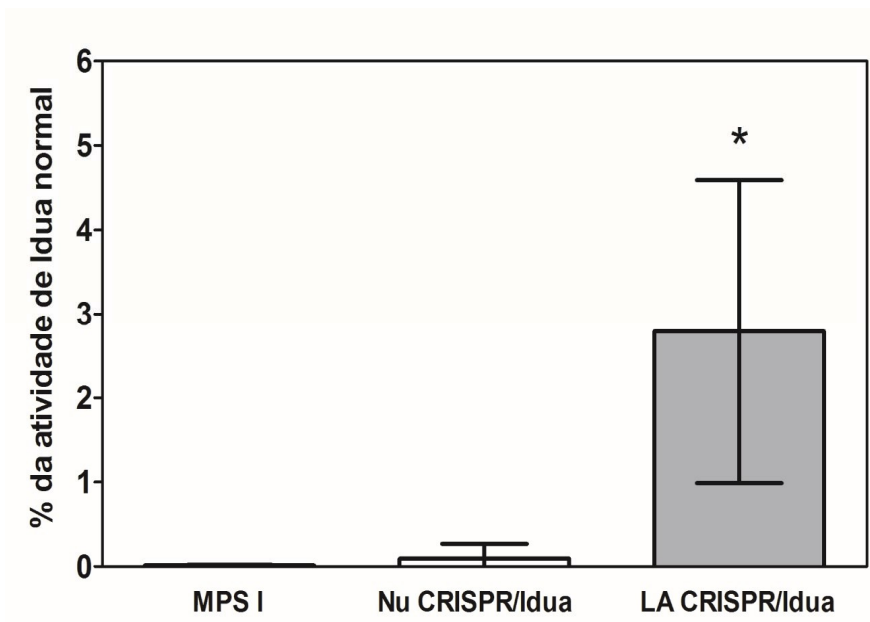


Figura 2

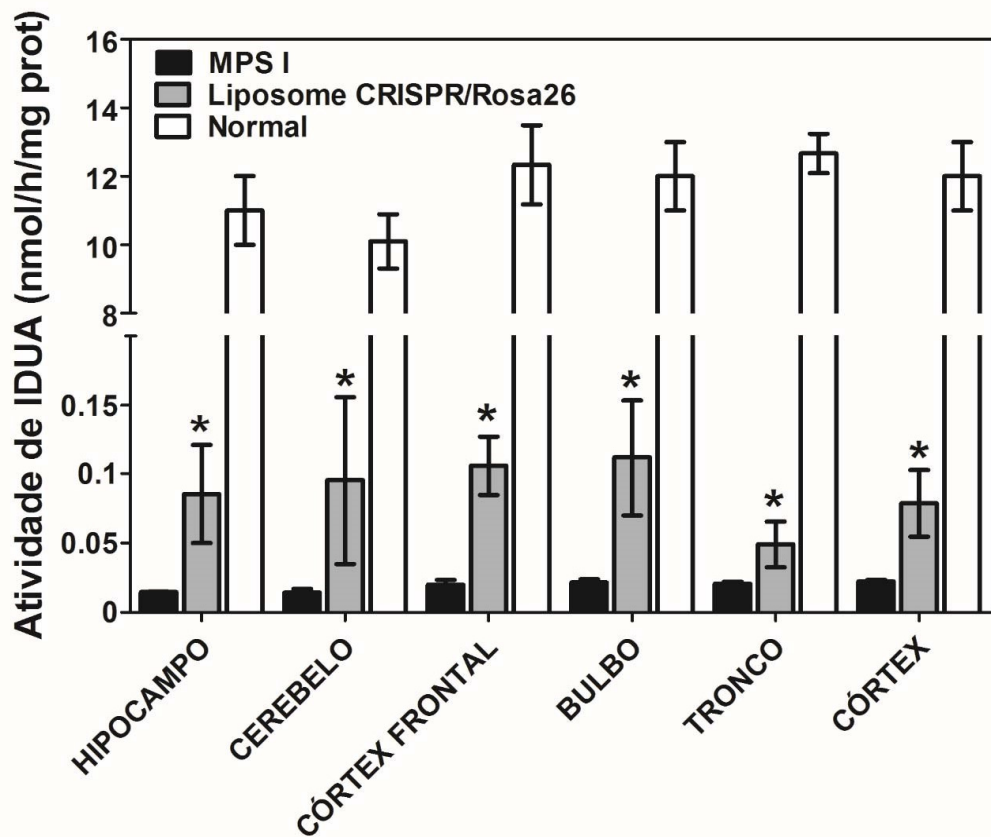


Figura 3

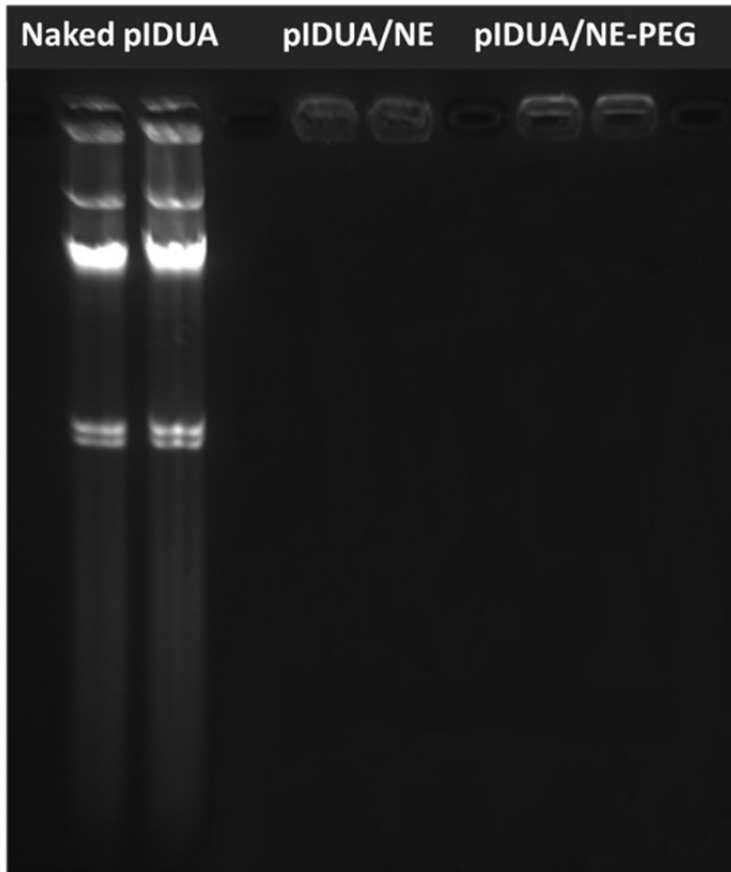


Figura 4

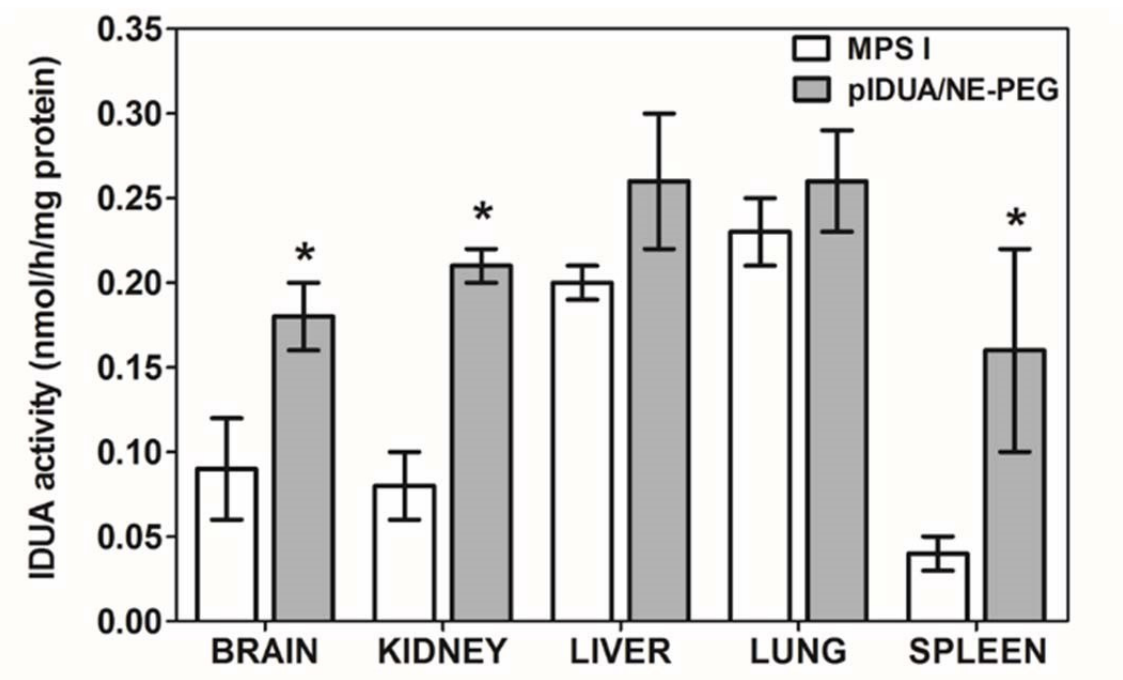


Figura 5



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

PORTARIA Nº 7906 de 05/10/2016

Delegação de competência ao Secretário de Desenvolvimento Tecnológico.

O REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto nos artigos 11 e 12 do Decreto-Lei nº 200, de 25 de fevereiro de 1967, regulamentado pelo Decreto nº 62.460, de 25 de março de 1968,

RESOLVE:

Artigo 1º - Delegar competência ao Professor **JOSÉ LUIS DUARTE RIBEIRO**, Secretário de Desenvolvimento Tecnológico, para, a partir de 30 de setembro de 2016 e sem prejuízo das atribuições que regimentalmente competem ao titular do mesmo cargo, praticar os atos administrativos a seguir enumerados:

1. Solicitação de registro da propriedade intelectual, junto aos órgãos competentes do país e do exterior, bem como instrumentos de licenciamento de tecnologia, sem exclusividade, a seguir relacionados:

1.1 - registro de patente (patentes de invenção, modelos de utilidade, desenho industrial, etc.);

1.2 - certificado de adição;

1.3 - registro de marca;

1.4 - transferência de titularidade;

1.5 - registro de software;

1.6 - registro e proteção de cultivares;

1.7 - petições para pagamento de anuidade, atendimento de exigências, exames de patentes, etc;

1.8 - demais documentos que tenham por objetivo solicitar registro de propriedade intelectual da UFRGS;

1.9 - contratos de licenciamento de propriedade intelectual da UFRGS, na forma não exclusiva para o licenciante, com prévia análise da Procuradoria Geral da UFRGS.

2. Instrumentos legais firmados com parceiros externos, que não envolvem recursos financeiros, apenas resguardam direitos de propriedade intelectual da instituição.

2.1 - contratos de Co-Titularidade - Estes instrumentos legais são Firmados com o objetivo de estabelecer os percentuais de co-titularidade e as obrigações de cada uma das partes, com relação ao uso e manutenção dos direitos de propriedade intelectual sobre uma tecnologia;

2.2 - acordos de Confidencialidade - Os Acordos de Confidencialidade têm por objetivo proteger a tecnologia, desenvolvida pelos pesquisadores da UFRGS, com vistas a possibilitar seu emprego no processo produtivo econômico por parte de algum parceiro externo;

2.3 - acordos de Transferência de Material Biológico - Estes Acordos visam assegurar os direitos das partes sobre os materiais biológicos de sua propriedade, na transferência, para fins de pesquisa, para uma instituição parceira.

3. Firmar documentos, na esfera de competência da Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico - SEDETEC, com parceiros externos onde não ocorram repasse de recursos financeiros, nem envolvam despesas para as partes.

3.1 - contratos onde, no objeto, estejam previstas atividades de P&D, com prévia análise legal pela Procuradoria Geral da UFRGS;

3.2 - termos de compromisso.

4. Firmar documentos onde exista repasse de recursos do exterior, voltados para P&D, mas que não gerem obrigações financeiras para a Instituição.

4.1 - auxílio de países desenvolvidos;

4.2 - doações oriundas do exterior;

4.3 - recursos de fundos perdidos.

Parágrafo único: A administração financeira destes recursos, ficará a cargo da PROPLAN/UFRGS.

Artigo 2º - As assinaturas de convênios não estão incluídas na delegação de competência constante no artigo anterior, permanecendo com a tramitação atual e firmada pelo Reitor.

Artigo 3º - A autoridade a que se refere o artigo 1º da presente Portaria, considerando a necessidade do serviço, poderá subdelegar os poderes que, por este ato, lhe são delegados.

Artigo 4º - Revogam-se as disposições em contrário.

RUI VICENTE OPPERMANN.