

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(43) Data de Publicação Internacional
02 de Abril de 2020 (02.04.2020)

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2020/061670 A1

(51) Classificação Internacional de Patentes:

A61K 38/50 (2006.01) A61K 47/69 (2017.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01) A61P 35/02 (2006.01)

(72) Inventores: ANTONIETA FERRARA, Maria; Rua Marechal Marques Porto, 2, apto 608 - Tijuca, 20270-260 Rio de Janeiro (BR). PERALES, Jonas; Rua Eneida de Moraes, 276, apto 105 - Jardim Carioca - Ilha do Governador, 21920-230 Rio de Janeiro (BR). GONÇALVES DA ROCHA, Surza Lúcia; Rua Doutor O'Reilly, 201 - Rea-lengo, 21710-330 Rio de Janeiro (BR). FACCHINETTI DE CASTRO GIRÃO, Luciana; Rua General Andrade Neves, 275, apto. 703, 24210-001 Niterói (BR). PINTO DA SILVA BOM, Elba; Rua Timóteo da Costa, 82, apto 104 - Leblon, 22450-130 Rio de Janeiro (BR). TEIXEIRA DE AZEVEDO CORVO, Maria Luísa; Calcada do Tojal, 38 R/C Frente, 1500-595 Lisboa (PT). COLLA CARVALHEIRO, Manuela; Rua Fernando Namora, 45 Edif B. 6º C, 1600-451 Lisboa (BR). BÁRBARA DOS ANJOS FIGUEIRA MARTINS, Maria; Rua Luís Pedrosa de Barros, 5, 1400-237 Lisboa (PT).

(21) Número do Pedido Internacional:

PCT/BR2019/050419

(22) Data do Depósito Internacional:

25 de Setembro de 2019 (25.09.2019)

(25) Língua de Depósito Internacional: Português

(26) Língua de Publicação: Português

(30) Dados Relativos à Prioridade:

BR102018069598-3
25 de Setembro de 2018 (25.09.2018) BR

(71) Requerente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO [BR/BR]; Rua Pedro Calmon, 550 - Cidade Universitária, 21941-901 Rio de Janeiro (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,

(54) Title: LIPOSOMAL FORMULATION, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, USE OF A LIPOSOMAL FORMULATION, METHOD FOR TREATING CANCER, AND PROCESS FOR PREPARING A LIPOSOMAL FORMULATION

(54) Título: FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UMA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL, MÉTODO PARA TRATAMENTO DE CÂNCER, E, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL

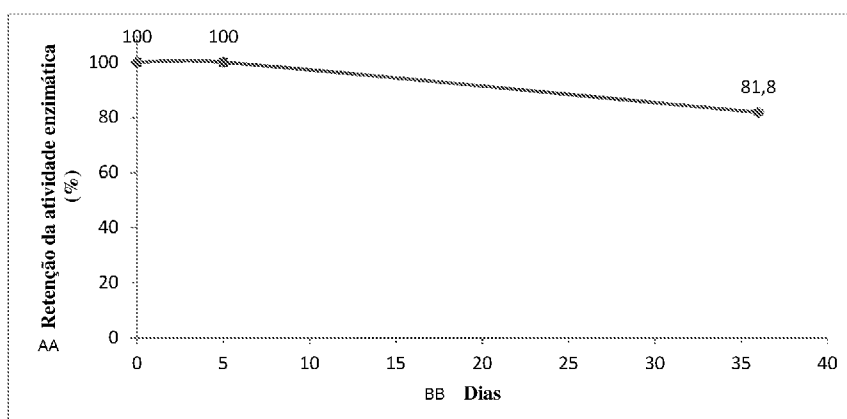


FIGURA 7

AA Enzyme activity retention
BB Days

(57) Abstract: The present invention relates to liposomal formulations comprising enzymes with asparaginase activity covalently linked to the ends of polyethylene glycol molecules exposed on the surface of liposomes. The liposomal formulations described herein can be used for treating cancer, particularly leukemias.

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a formulações lipossomais compreendendo enzimas com atividade asparaginase ligadas covalentemente às extremidades de moléculas de polietileno glicol expostas na superfície de lipossomos. As formulações lipossomais aqui descritas são úteis no tratamento de câncer, particularmente leucemias.

(Continua na página seguinte)



WO 2020/061670 A1

CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarações sob a Regra 4.17:

— *relativa à autoria da invenção (Regra 4.17(iv))*

Publicado:

— *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*
— *em preto e branco; o pedido internacional tal como depositado contém cores ou níveis de cinza e pode ser baixado do PATENTSCOPE*

“FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UMA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL, MÉTODO PARA TRATAMENTO DE CÂNCER, E, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL”

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se ao campo da oncologia e da biotecnologia. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a formulações lipossomais compreendendo enzimas com atividade asparaginase ligadas covalentemente às extremidades de moléculas de polietileno glicol expostas na superfície de lipossomos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] A leucemia linfoblástica aguda é o câncer infantil mais frequente e afeta de três a cinco crianças a cada 100 mil. É uma doença progressiva, que necessita de urgência no tratamento, cujo objetivo é destruir o maior número de células afetadas. Com isso, a medula óssea recupera sua produção de células normais.

[0003] A enzima asparaginase é o principal medicamento para tratar a leucemia linfoblástica aguda, sendo considerada a "peça-chave" nas primeiras quatro semanas de tratamento. Pode também ser utilizada para tratar leucemia mieloide aguda (AML) em crianças e linfomas não Hodgkin (NHL) em crianças e adultos. Esta enzima catalisa a conversão da asparagina em ácido aspártico e amônio depletando-a da corrente sanguínea quando administrada. Sendo as células tumorais destes tipos de câncer deficientes em asparagina sintetase, necessitam de suprimento externo deste aminoácido e, como não o conseguem exogenamente, acabam por morrer.

[0004] Todos os medicamentos presentes no mercado são formulados a partir de asparaginase de origem bacteriana, obtida a partir de *Escherichia coli* e de *Erwinia chrysanthemi*. Esta última é empregada alternativamente à enzima de *E. coli* devido às diferenças nas especificidades imunológicas, para

minimizar os efeitos colaterais em pacientes hipersensíveis. Entretanto, enzimas bacterianas provocam sérias reações imunológicas, assim como a característica de o paciente desenvolver sensibilidade ao medicamento. Apesar de seu efeito terapêutico, os medicamentos à base de asparaginase bacteriana provocam reações adversas como anafilaxia, trombose, hemorragia, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, entre outras. Em alguns casos, estes efeitos são tão severos que impossibilitam o uso prolongado do medicamento, tendo sido observados, até, casos de óbito durante o tratamento (Müller e Boos, 1998).

[0005] A asparaginase II da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, codificada pelo gene *ASP3*, sendo originada de um eucarioto, apresentaria potencial imunogênico inferior ao das enzimas bacterianas. Adicionalmente, essa enzima apresenta potencial para uso terapêutico devido a sua elevada estabilidade e pH e temperatura ótimos próximos às condições fisiológicas.

[0006] No pedido de patente PI0406168-3, o gene *ASP3* de *S. cerevisiae* foi clonado com sucesso na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Um estudo preliminar de citotoxicidade *in vitro* contra células de leucemia mieloide crônica confirmou a atividade antileucêmica da asparaginase II de *S. cerevisiae* expressa em *P. pastoris* (Girão et al., 2016).

[0007] Outro fator considerado limitante ao uso terapêutico da asparaginase bacteriana é a curta meia-vida da enzima no sangue, que é em torno de 30 horas para a de *E. coli* e de 17 horas para a de *E. chrisanthemi*. Essa curta meia-vida faz com que aplicações sucessivas sejam necessárias.

[0008] No sentido de melhorar as propriedades farmacológicas e imunológicas da asparaginase, uma formulação modificando a asparaginase com polietileno glicol (PEG), na qual unidades de monometoxi PEG são ligadas covalentemente à enzima, foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1994, estando sob o nome comercial de Oncaspar. Esta modificação aumenta a meia-vida da asparaginase no sangue para seis

dias, além de reduzir significativamente os efeitos imunogênicos (Graham, 2003). Seu custo (por unidade enzimática), entretanto, é cerca de 60 vezes mais alto em relação à preparação convencional da enzima.

[0009] Alternativamente, formulações lipossomais podem ser usadas para aumentar a meia-vida plasmática de enzimas e diminuir os efeitos adversos associados à sua administração. Corvo et al., 2015 construíram formulações lipossomais pela ligação da enzima superóxido dismutase à superfície de lipossomos.

[00010] As vantagens da invenção serão evidentes na descrição da invenção fornecida neste documento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[00011] A presente invenção tem por objetivo prover uma formulação lipossomal que solucione os principais problemas do estado da técnica listados anteriormente.

[00012] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê uma formulação lipossomal, aqui também denominada enzimossomo, compreendendo a enzima com atividade asparaginase ligadas às extremidades de moléculas de polietileno glicol expostas na superfície de lipossomos.

[00013] Em um segundo aspecto, a presente invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo a formulação lipossomal como acima definida.

[00014] Em um terceiro aspecto, a presente invenção provê o uso da formulação lipossomal como acima definida na preparação de um medicamento para tratamento de câncer.

[00015] Em um quarto aspecto, a presente invenção provê um método para tratamento de câncer, compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma formulação lipossomal como acima definida a um indivíduo em necessidade do mesmo.

[00016] Em um quinto aspecto, a presente invenção provê um processo

para preparação da formulação lipossomal como acima definida compreendendo as etapas de:

- introdução de grupos reativos na enzima com atividade asparaginase por ligação a cadeia lateral das lisinas expostas a superfície da asparaginase, deixando as extremidades tioladas;
- ativação da enzima com atividade asparaginase tiolada; e
- ligação da enzima com atividade asparaginase ativada ao lipossomo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00017] A Figura 1 mostra o perfil obtido na purificação da ASP-ATA por cromatografia de exclusão molecular em uma coluna ECONO 10DG utilizando tampão citrato de sódio 10 mM + NaCl 140 mM, pH 6.

[00018] A Figura 2 mostra o perfil cromatográfico em Sephadex G-200 da Asparaginase-AT+lipossomos. A linha em vermelho representa a detecção de lipídeos mensurada pela turbidez a 450 nm e a verde a dosagem de proteínas das frações.

[00019] A Figura 3 mostra o perfil antiproliferativo dos enzimosomos contra células Jurkat por 48 horas.

[00020] A Figura 4 mostra o perfil antiproliferativo dos enzimosomos contra células Jurkat por 72 horas.

[00021] A Figura 5 mostra o perfil antiproliferativo dos enzimosomos contra células K562 por 48 horas.

[00022] A Figura 6 mostra o perfil antiproliferativo dos enzimosomos contra células K562 por 72 horas.

[00023] A Figura 7 mostra a manutenção da atividade enzimática dos enzimosomos a 4°C.

[00024] A Figura 8 mostra a manutenção da atividade enzimática dos lipossomos com asparaginase encapsulada no espaço interno aquoso a 4°C.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00025] A não ser que sejam definidos de maneira diferente, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado entendido por um técnico no assunto ao qual a invenção pertence. A terminologia utilizada na descrição da invenção tem finalidade de descrever concretizações particulares somente e não tem a intenção de limitar o escopo dos ensinamentos. A não ser que seja indicado de forma diferente, todos os números expressando quantidades, porcentagens e proporções, e outros valores numéricos usados no relatório descritivo e nas reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados, em todos os casos, pelo termo “cerca de”. Assim, a não ser que seja indicado o contrário, os parâmetros numéricos mostrados no relatório descritivo e nas reivindicações são aproximações que podem variar, dependendo das propriedades a serem obtidas.

[00026] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê uma formulação lipossomal, aqui também denominada enzimosomo, compreendendo enzima com atividade asparaginase ligada às extremidades de moléculas de polietileno glicol expostas na superfície de lipossomos.

[00027] Os lipossomos aqui descritos podem ser qualquer lipossomo conhecido na técnica. De forma geral, os lipossomos são vesículas formadas por bicamadas lipídicas concêntricas, formando uma cavidade em seu interior.

[00028] De forma geral, a bicamada lipídica é formada por qualquer molécula anfifílica conhecida na técnica, de origem natural ou sintética. A molécula anfifílica tipicamente possui uma porção hidrofílica (cabeça hidrofílica) e uma porção hidrofóbica (cauda hidrofóbica). As referidas moléculas anfifílicas são comumente dispostas em duas camadas de modo que suas porções hidrofóbicas são orientadas para dentro da bicamada (fase hidrofóbica) e suas porções hidrofílicas são orientadas para fora da bicamada (fase hidrofílica).

[00029] A porção hidrofílica pode compreender grupos polares ou carregados tais como carboidratos, fosfato, carboxílico, sulfato, amino,

sulfidril, nitro, hidróxi e outros grupos semelhantes. A porção hidrofóbica pode compreender grupos apolares que incluem, mas não são limitados a, grupos hidrocarbonetos alifáticos insaturados e saturados de cadeia longa e grupos substituídos por um ou mais grupo(s) aromático(s), ciclo-alifático(s) ou heterocíclico(s).

[00030] Os lipossomos podem ser formados por uma variedade de moléculas lipídicas, as quais podem ser catiônicas, aniônicas ou neutras. Os lipossomos podem ser ainda compostos por misturas de moléculas lipídicas catiônicas, aniônicas e neutras. Misturas de lipídeos neutros e aniônicos, por exemplo, resultam na formação de lipossomos aniônicos.

[00031] Moléculas lipídicas neutras existem em uma forma zwitteriônica não carregada ou neutra em um pH selecionado. Exemplos não limitativos de moléculas lipídicas neutras em pH fisiológico são diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomiéline, cefalina, colesterol, cerebrosídeos e diacilgliceróis. Exemplos não limitativos de moléculas lipídicas zwitteriônicas incluem dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), e dioleoilfosfatidilserina (DOPS).

[00032] Uma molécula lipídica é aniônica quando a mesma é carregada negativamente em pH fisiológico. Exemplos não limitativos de moléculas lipídicas aniônicas são fosfatidilglicerol, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoilfosfatidiletanolaminas, N-succinilfosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG), e outros grupos de modificação aniônicos ligados a lipídeos neutros.

[00033] Em uma forma de realização, os lipossomos da presente invenção são lipossomos neutros/aniônicos. A determinação da carga de um lipossomo pode ser medida por meio de seu potencial zeta. Em uma concretização exemplar, o potencial zeta do lipossomo antes da conjugação com a enzima com atividade asparaginase é próximo a zero, por exemplo, na

faixa de -6 a -2 mV.

[00034] Exemplos de moléculas lipídicas anfifáticas que compõem os lipossomos da presente invenção incluem, mas não são limitados a, fosfolipídeos, aminolipídeos e esfingolipídeos.

[00035] Em uma forma de realização, os lipossomos são formados por fosfolipídeos como, por exemplo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina e semelhantes. Entretanto, outros componentes lipídicos, como por exemplo, colesterol e esfingomielinatambém podem fazer parte dos lipossomos da presente invenção.

[00036] Em uma forma de realização, os lipossomos podem incluir a ligação de estabilizadores estéricos e/ou grupos funcionais. Grupos funcionais são aqueles que podem ser usados para ligar um componente do lipossomo a uma outra porção, tal como uma proteína.

[00037] Os referidos grupos funcionais podem incluir, de forma não limitativa, maleimida. Os referidos estabilizadores estéricos incluem, por exemplo, um do grupo que consiste em polietileno glicol (PEG); poli-L-lisina (PLL); monosialogangliosídeo (GM1); poli(vinil pirrolidona) (PVP); poli(acrilamida) (PAA); poli(2-metil-2-oxazolina); poli(2-etil-2-oxazolina); fosfatidilpoliglicerol; poli[N-(2-hidroxipropil) metacrilamida]; poli-N-vinilpirrolidonas anfifílicas; Polímero à base de L-aminoácido; e álcool polivinílico.

[00038] Em uma forma de realização, pelo menos um componente do lipossomo é funcionalizado (ou reativo). Um componente funcionalizado é um componente que compreende um grupo reativo que pode ser usado para reticular reagentes e porções. O grupo reativo pode estar localizado em qualquer lugar na molécula lipídica. Um exemplo de grupo reativo é um grupo maleimida. Outros exemplos incluem, de forma não limitativa grupos reativos tiol, grupos amino tais como aminas primária e secundária, grupos carboxila,

grupos hidroxila, grupos aldeído, grupos alcino, grupos azida, carbonilas, grupos haloacetila (por exemplo, iodoacetila), grupos imidoéster, ésteres N-hidroxissuccinimida, grupos sulfidril, grupos dissulfeto de piridila, e semelhantes.

[00039] Em uma forma de realização, o lipossomo é composto de fosfatidilcolina de ovo (Egg-PC), colesterol (Chol), maleimido-poliétileno glicol-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (Maleimido-PEG-DSPE) e poliétileno glicol-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (PEG-DSPE).

[00040] Em uma concretização exemplar, a proporção entre Egg-PC : Chol : Maleimido-PEG-DSPE : PEG-DSPE é de 68,25 : 30,5 : 0,75 : 0,50.

[00041] Em uma forma de realização, a concentração lipídica inicial do lipossomo está na faixa de 5 a 35 $\mu\text{mol/mL}$. Em uma concretização exemplar, a concentração lipídica inicial do lipossomo é de aproximadamente 20 $\mu\text{mol/mL}$.

[00042] Devido ao mecanismo de ação da asparaginase, é necessário que os enzimosossomos tenham livre circulação na corrente sanguínea e partículas maiores que 200 nm poderiam ficar presas e serem degradadas no fígado, diminuindo o tempo de meia-vida da formulação.

[00043] Em uma forma de realização, os lipossomos da presente invenção têm um tamanho de partícula de 80 a 200 nm. Em uma concretização exemplar, os lipossomos da presente invenção têm um tamanho de partícula de aproximadamente 140 nm.

[00044] Em uma forma de realização, as formulações lipossomais têm um tamanho de partícula de aproximadamente 80 a 200 nm. Em uma concretização exemplar, as formulações lipossomais da presente invenção têm um tamanho de partícula de aproximadamente 140 a 160 nm.

[00045] Os lipossomos usados para preparação das formulações lipossomais podem ser obtidos por qualquer metodologia conhecida no estado da técnica. Um exemplo não limitativo de preparação é fornecido no

documento Corvo et al, 2015, o qual é aqui incorporado por referência.

[00046] Em Corvo et al, 2015, as formulações lipossomais são preparadas para uso com a enzima superóxido dismutase. Os inventores da presente invenção observaram que as formulações lipossomais para uso com asparaginase tiveram que ser otimizados para obtenção de uma preparação estável e biologicamente ativa.

[00047] Mais precisamente, foram modificados, por exemplo, a razão molar reagente SATA : Enzima, o tamanho da partícula e razão molar Maleimido-PEG-PE : Enzima. Todos esses fatores influem significativamente na atividade farmacológica e na estabilidade da formulação.

[00048] As condições operacionais devem ser determinadas para cada enzima, pois não existe correlação direta entre as características estruturais, físico-químicas e bioquímicas da enzima a ser formulada e essas variáveis. Também não estão disponíveis estudos no estado da técnica com outros modelos de doença que não a artrite reumatoide (doença alvo da enzima Superóxido Dismutase) que pudessem permitir a extrapolação dessas variáveis.

[00049] A Asparaginase difere da Superóxido Dismutase em sequência de aminoácidos, parâmetros físico-químicos e aplicação terapêutica e, portanto, os parâmetros de reação para a produção dos enzimosomas precisaram ser modificados. Como exemplo, o tamanho de partícula para os enzimosomas da Superóxido Dismutase precisam ser em torno de 50 nm, uma vez que para o tratamento de artrite, estes enzimosomas precisam estar próximos do alvo terapêutico uma vez que partículas menores enfrentam menos barreiras mecânicas no organismo; já para a Asparaginase, isso não se faz necessário, já que esta atua na depleção da asparagina na corrente sanguínea e partículas de tamanho entre 100 e 200 nm são suficientes para este fim. Assim, a metodologia para o preparo dos enzimosomas de asparaginase foi desenhada com o objetivo de minimizar alterações na estrutura da enzima que poderiam levar a perda da sua atividade catalítica e, ao mesmo tempo, maximizar a eficiência da

conjugação e manter o longo tempo de meia-vida dos lipossomas. Controlando a proporção de PEG funcionalizado e não funcionalizado na superfície dos enzimosomas, foi alcançada uma carga enzimática suficiente na superfície dos enzimosomas de longo tempo de circulação, adequada para a atividade biológica esperada. Além disso, a integridade estrutural das vesículas foi mantida, assim como a atividade enzimática indicando uma estrutura enzimática preservada.

[00050] As formulações lipossomais podem ser desenhadas de modo a possuir tempo de meia-vida plasmática aumentada e uma diminuição dos efeitos adversos atribuídos à administração da enzima associada à formulação.

[00051] Em uma forma de realização, as formulações lipossomais, ou enzimosomas, consistem em uma preparação obtida por ligação covalente entre enzimas com atividade asparaginase e a extremidade de moléculas de polietileno glicol funcionalizadas expostas na superfície de lipossomos.

[00052] Em uma concretização exemplar, a molécula de polietileno glicol funcionalizada é Maleimido-PEG-DSPE.

[00053] Em uma concretização exemplar, a razão molar Maleimido-PEG-DSPE : enzima com atividade asparaginase é de 20:1 a 60:1. Em uma concretização exemplar particular, a razão molar é de aproximadamente 40:1.

[00054] As formulações lipossomais aqui descritas apresentam longo tempo de circulação e apresentam atividade enzimática por si, sem a necessidade prévia de liberação de seu conteúdo. Além disso, o fato de a partícula ser peguilada faz com que a enzima fique “mascarada”, o que diminui a probabilidade de haver reações imunológicas.

[00055] Conforme aqui referida, “enzima com atividade asparaginase” relaciona-se a qualquer enzima que promova a conversão de asparagina a ácido aspártico. “Enzima com atividade asparaginase” e “asparaginase” são usados aqui de forma intercambiável.

[00056] Em uma forma de realização, a enzima com atividade

asparaginase é de origem microbiana. Em uma concretização exemplar, a enzima com atividade asparaginase é de uma bactéria. Exemplos não limitativos de asparaginase bacterianas são asparaginases de bactérias do gênero *Escherichia* ou *Erwinia*. Em outra concretização exemplar, a enzima com atividade asparaginase é de uma levedura. Exemplos não limitativos de asparaginase de leveduras são asparaginases de leveduras do gênero *Saccharomyces*.

[00057] Em uma concretização exemplar preferencial, a enzima com atividade asparaginase é a enzima asparaginase da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

[00058] A levedura *S. cerevisiae* produz dois tipos de asparaginase, sendo que uma delas é uma enzima intracelular (asparaginase I, codificada pelo gene *ASP 1*) e a outra uma enzima periplasmática (asparaginase II, codificada pelo gene *ASP 3*).

[00059] A produção da enzima asparaginase II de *S. cerevisiae* não é reprimida por carbono, não responde à indução pelo aminoácido asparagina e é estimulada em condições de limitação por nitrogênio. As fontes preferenciais de nitrogênio, como, por exemplo, o íon amônio, a glutamina e a asparagina, reprimem a produção da enzima, enquanto as fontes não preferenciais de nitrogênio, como, por exemplo, a prolina e ureia ou ainda a estarvação por nitrogênio permitem a obtenção de níveis mais elevados de enzima.

[00060] A asparaginase II de *S. cerevisiae* (precursor não processado) apresenta 362 aminoácidos e sua massa molecular é de 38686 Da. Essa enzima apresenta uma sequência sinal de 25 aminoácidos em seu N-terminal, onde é clivada para sofrer posterior glicosilação. Seu sítio ativo, assim como nas enzimas asparaginases de *E. coli* e *E. chrysanthemi*, é composto por resíduos de treonina, aspartato e lisina.

[00061] Em uma forma de realização, a enzima com atividade asparaginase é a asparaginase II de *S. cerevisiae* codificada pelo gene *ASP3*

com sequência de polinucleotídeos pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idêntica à sequência de SEQ ID NO: 1.

[00062] Em uma forma de realização, a enzima com atividade asparaginase é a asparaginase II de *S. cerevisiae* codificada pelo gene *ASP3* de SEQ ID NO: 1.

[00063] Em uma forma de realização, a enzima com atividade asparaginase é a asparaginase II de *S. cerevisiae* compreendendo a sequência de aminoácidos codificada pelo gene de SEQ ID NO: 1.

[00064] Em uma forma de realização, a enzima com atividade asparaginase é a asparaginase II de *S. cerevisiae* compreendendo a sequência de aminoácidos pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idêntica à sequência de SEQ ID NO: 2.

[00065] Em uma forma de realização, a enzima com atividade asparaginase é a asparaginase II de *S. cerevisiae* compreendendo a sequência de aminoácidos como definida na SEQ ID NO: 2.

[00066] As enzimas com atividade asparaginase aqui referidas podem ser obtidas por qualquer metodologia disponível na técnica, as quais são de amplo conhecimento de um técnico no assunto.

[00067] Em uma forma de realização, a enzima com atividade asparaginase é obtida por expressão heteróloga em uma levedura metilotrófica, conforme descrito no documento PI 0406168-3, o qual é aqui incorporado por referência.

[00068] Os parâmetros reacionais de enzimosomas devem ser determinados dependendo da enzima a ser ligada ao lipossomo, de modo a obter uma preparação estável e biologicamente ativa. Os referidos parâmetros variam

de acordo com as características da proteína a ser formulada, por exemplo, sua sequência primária, hidrofobicidade, estrutura quaternária, estabilidade a pH e temperatura, bem como sua ação terapêutica. Ademais, até onde é sabido na técnica, não existe correlação direta entre as características estruturais, físico-químicas e bioquímicas da enzima a ser formulada e as variáveis do processo.

[00069] Portanto, parâmetros de formulação que são adequadas para um tipo enzimático e usadas para o tratamento de uma doença específica podem não ser aplicados a uma formulação diferente que utiliza outro tipo enzimático.

[00070] Modelos de formulações lipossomais com ligação de enzimas com atividade asparaginase à superfície de lipossomos peguilados, ou para uso em tratamento de leucemia ou qualquer tipo de câncer, não estavam disponíveis na técnica à época do desenvolvimento da presente invenção.

[00071] Assim, os inventores da presente invenção desenvolveram a metodologia de preparo dos enzimosomos de asparaginase com o objetivo de minimizar alterações na estrutura da enzima que poderiam levar a perda da atividade catalítica e, ao mesmo tempo, maximizar a eficiência da conjugação e manter o longo tempo de meia-vida dos lipossomos.

[00072] Controlando a proporção de PEG funcionalizado e não funcionalizado na superfície dos enzimosomos, foi alcançada uma carga enzimática suficiente para a atividade biológica esperada. Além disso, a integridade estrutural das vesículas foi mantida, assim como a atividade enzimática, o que indica uma estrutura enzimática preservada.

[00073] Em uma forma de realização, a formulação lipossomal de acordo com a presente invenção é útil no tratamento de câncer. Em uma concretização exemplar particular, o câncer é leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crônica ou linfomas não Hodgkin. Em uma concretização exemplar mais particular, a leucemia é leucemia linfoblástica aguda.

[00074] Em um outro aspecto, a presente invenção provê uma composição farmacêutica que compreende a formulação lipossomal de acordo

com a presente invenção e pelo menos um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[00075] Conforme aqui definido, o termo “carreadores ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis” refere-se a ingredientes compatíveis com outros ingredientes contidos em preparações farmacêuticas e que não apresentam efeito terapêutico e não são prejudiciais a seres humanos ou animais.

[00076] Os carreadores ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis são selecionados em função da apresentação final da composição da presente invenção que pode ser na forma de solução injetável para administração intramuscular e/ou intravenosa.

[00077] Excipientes, carreadores ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis não apresentam toxicidade ao organismo receptor nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes como ácido ascórbico e metionina; conservantes como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, fenol, álcool butílico, álcool benzílico, alquil parabeno como metil- e propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol e m-cresol; proteínas como albumina, gelatina ou imunoglobulinas; aminoácidos, monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos como glicose, manose, sucrose, manitol ou sorbitol; excipientes poliméricos como polivinilpirrolidonas, Ficoll®, dextrinas e polietileno glicóis; agentes de sabor; adoçantes; agentes anti-estáticos; agentes quelantes como EDTA ou EGTA; sais liberadores de íons como sódio; complexos metálicos; surfactantes não-iônicos como polissorbato 20 e 80; lipídeos como fosfolipídeos, ácidos graxos e esteroides como colesterol. Métodos para preparação de várias composições farmacêuticas são bem conhecidos, ou serão aparentes à luz da presente invenção, pelo especialista da arte em tecnologia farmacêutica.

[00078] A composição farmacêutica de acordo com a presente invenção

compreende a formulação lipossomal da presente invenção e um carreador ou excipiente farmacologicamente aceitável.

[00079] Em um outro aspecto, a presente invenção provê o uso da formulação lipossomal da invenção na manufatura de um medicamento para tratamento de câncer. Em uma concretização exemplar, o câncer é selecionado a partir de leucemia linfóide aguda, leucemia mieloide crônica e linfomas não Hodgkin. Em uma concretização exemplar particular, a leucemia é leucemia linfóide aguda.

[00080] Em um outro aspecto, a invenção provê um método para tratamento de câncer que compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz da formulação lipossomal da presente invenção a um indivíduo em necessidade do mesmo.

[00081] Conforme aqui definido, o termo “quantidade terapêuticamente eficaz” refere-se a uma quantidade da formulação lipossomal que fornece atividade contra câncer, quando administrada de acordo com a dose e via de administração apropriada.

[00082] Conforme aqui definido, o termo “indivíduo” refere-se a seres humanos e animais. Preferencialmente, o indivíduo é um ser humano.

[00083] A quantidade efetiva precisa para um indivíduo humano dependerá da gravidade do estado de doença, da saúde geral do indivíduo, da idade, do peso, e do sexo do sujeito, da dieta, do tempo e da frequência de administração, da combinação/combinções de drogas, das sensibilidades de reação, e da tolerância/resposta à terapia. Assim, doses a serem fornecidas dependem de um número de fatores que não podem ser mensuradas antes que os estudos de testes clínicos sejam feitos. O técnico no assunto, no entanto, sabe como chegar a doses adequadas para diferentes tratamentos.

[00084] Em um outro aspecto, a presente invenção provê um processo para a preparação da formulação lipossomal. O processo aqui descrito foi desenvolvido pelos inventores com o objetivo de minimizar alterações na

estrutura da enzima, o que poderia levar à perda da atividade catalítica e, ao mesmo tempo, maximizar a eficiência da conjugação e manter o longo tempo de meia-vida dos lipossomos.

[00085] O processo de preparação compreende as etapas de:

- introdução de grupos reativos na enzima com atividade asparaginase por ligação a cadeia lateral das lisinas expostas a superfície da asparaginase, deixando as extremidades tioladas;

- ativação da enzima com atividade asparaginase tiolada; e

- ligação da enzima com atividade asparaginase ativada ao lipossomo.

[00086] Em uma forma de realização, a enzima com atividade asparaginase é ativada por tioação utilizando o reagente bifuncional N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA). Em uma concretização, a razão molar SATA : enzima é de 18:1 a 24:1. Em uma concretização exemplar, a razão molar SATA : enzima é de aproximadamente 22:1.

[00087] Em uma forma de realização, a enzima tiolada é purificada para separá-la do excesso de SATA restante da reação. O processo de purificação pode ser realizado por qualquer técnica amplamente conhecida na técnica. Em uma concretização exemplar, a purificação é realizada por cromatografia de exclusão molecular.

[00088] Em uma forma de realização, para a ligação da enzima com atividade asparaginase ao lipossomo, a enzima tiolada é ativada (desprotegida), deixando os grupamentos SH reativos expostos. Em uma concretização exemplar, a ativação da enzima tiolada é feita por desacetilação na presença de uma solução de hidroxilamina.

[00089] Em uma forma de realização, a enzima tiolada ativada é ligada à extremidade da molécula de polietileno glicol funcionalizada exposta na superfície do lipossomo por ligação covalente. Em uma concretização exemplar, a enzima tiolada ativada se liga ao grupamento maleimido presente

no lipídeo DSPE-PEG-Maleimido.

[00090] Em uma forma de realização, o processo compreende a etapa adicional de separação da enzima com atividade asparaginase ligada ao lipossomo da enzima com atividade asparaginase não ligada. Em uma concretização exemplar, a separação é feita por ultracentrifugação.

[00091] Os exemplos citados a seguir são meramente ilustrativos, devendo ser empregados somente para uma melhor compreensão dos desenvolvimentos constantes na presente invenção, não devendo, contudo, serem utilizados com o intuito de limitar os objetos descritos.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Produção da asparaginase

[00092] Foi utilizada uma linhagem de *P. pastoris* recombinante contendo o gene *ASP3*, que codifica a asparaginase II de *S. cerevisiae* (INCQS 50002), desenvolvida por Ferrara et al. (2006). A levedura foi cultivada em frascos de Erlenmeyer de 1000 mL contendo 100 mL de meio BMG (tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0; YNB sem aminoácidos e sem sulfato de amônio 3,4 g/L; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 10 g/L; glicerol 10 g/L; biotina 0,4 mg/L) a temperatura de 28°C e agitação de 250 rpm, até o esgotamento do glicerol (cerca de 24 h). Em seguida, o pH do meio de cultura foi ajustado a 6,0 com solução de KOH e o metanol foi adicionado na proporção de 5 mL/L para induzir a produção da enzima. As células contendo a asparaginase periplásmica foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 3000 x g por 15 min.

[00093] Para a obtenção do extrato bruto enzimático, foi utilizado um protocolo de extração alcalina (Ferrara et al., 2010), empregando-se solução de fosfato de sódio/potássio 500 mM, pH 11,5 com cisteína 10 mM. As células íntegras foram ressuspensas nesta solução, na proporção de 10 mL/g (pellet úmido), por 2 horas a temperatura ambiente. A seguir, o extrato bruto contendo

a asparaginase foi separado dos debris celulares por centrifugação a 3000 x g por 15 min e armazenado em freezer para posterior utilização.

[00094] O extrato bruto foi purificado em quatro etapas: **(i)** ultrafiltração em membranas de celulose de corte definido em 50 kDa (Millipore) (7 ciclos, a 4,500 x g por 7 minutos a 4°C); **(ii)** cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose CL-4B (GE Healthcare) acoplada a um equipamento de purificação Akta purifier 10 (GE Healthcare) (volume aplicado: 4 mL; volume da coluna: 12 mL; eluente A: tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7, contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 M; eluente B: tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7; gradiente: linear de 0 – 100% de B; velocidade do fluxo: 1 mL/min; volume coletado: 1,2 mL por tubo; detecção: 215 e 280 nm); **(iii)** ultrafiltração em sistema Amicon 10 kDa utilizando tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 a 4°C; **(iv)** cromatografia de troca aniônica Hitrap Canto-Q (GE Healthcare) acoplada a um equipamento de purificação Akta purifier 10 (GE Healthcare) (volume aplicado: 1 mL; volume da coluna: 1 mL; eluente A: tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5; eluente B: acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 + NaCl 1M; gradiente: linear de 0 – 100% de B; velocidade do fluxo: 1 mL/min; volume coletado: 1,0 mL por tubo; detecção: 215 e 280 nm).

EXEMPLO 2: Preparação dos enzimosossomos

[00095] Os enzimosossomos de asparaginase foram preparados por ligação covalente entre a enzima e a extremidade de moléculas de polietilenoglicol funcionalizadas (Maleimido-PEG-DSPE) expostas na superfície dos lipossomos.

[00096] Para se conseguir obter uma ligação da enzima ao lipossomo resultando na formulação enzimosossomal, grupos reativos na enzima foram introduzidos de modo a que a reação com a extremidade do PEG ativado seja possível através de uma ligação covalente. Para tal, a enzima foi ativada previamente por tiolação utilizando o reagente bifuncional N-succinimidil-S-

acetil-tioacetato (SATA) na razão molar SATA:ASP de aproximadamente 22:1.

[00097] A composição lipídica da formulação lipossomal foi: fosfatidilcolina de ovo (Egg-PC) : colesterol (Chol) : maleimido-poliétileno glicol-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (Maleimido-PEG-DSPE) : poliétileno glicol-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (PEG-DSPE) na proporção de (68,25: 30,5: 0,75:0,50), sendo a concentração lipídica inicial de 20 $\mu\text{mol/mL}$. O dimensionamento das formulações dos enzimosomos foi realizado por extrusão num extrusor (LipexThermobarrelExtruder), com filtros com diâmetro de poro decrescente de 0,6, 0,4, 0,2 e 0,1 μm (Nucleopore® Track-EtchedMembranes, Whatman®, EUA), resultando em partículas lipossomais.

[00098] Para se proceder à ligação da asparaginase ao lipossomo, o ASP-ATA foi ativado (desproteção) por uma solução de citrato 10 mM + hidroxilamina 500 mM + EDTA 1 mM, pH 6, resultando em ASP-AT. A enzima não ligada foi separada da ligada por ultracentrifugação e coluna Sephadex G-200 (1 cm de diâmetro x 18 cm de altura).

[00099] Procedeu-se à purificação da ASP-ATA a fim de separá-la do excesso de SATA restante da reação. Este processo foi realizado por cromatografia de exclusão molecular em uma coluna ECONO 10DG (biorad). O perfil obtido na purificação é apresentado na Figura 1.

EXEMPLO 3: Caracterização dos enzimosomos

[000100] As formulações obtidas foram caracterizadas em termos de quantidade de enzima incorporada ou ligada dosada pelo método de Lowry, quantidade de lipídeo na forma lipossomal pelo método de Rouser, atividade enzimática mensurada pelo método de hidroxilaminólise (Ferrara et al, 2006), tamanho e polidispersão das partículas obtidas por *Dynamic Light Scattering* (DLS) e carga superficial das partículas (potencial zeta).

[000101] Observou-se que a ligação do SATA à asparaginase ocorreu, uma vez que houve um aumento da relação de absorbância a 280nm/238nm quando comparada a enzima sem modificação, sendo este último o comprimento de onda no qual o reagente N-succinimidil-S-acetil-tioacetato tem uma maior absorbância, servindo como parâmetro qualitativo de monitoramento da reação.

[000102] Posteriormente, a ASP-ATA foi desacetilada, deixando os grupamentos SH reativos expostos para que se ligassem ao grupamento maleimido presente no lipídeo DSPE-PEG-Maleimido. Para a desproteção, incubou-se a ASP-ATA com uma solução de citrato 10 mM + hidroxilamina 0,5 M + EDTA 1mM, pH 6. A seguir, incubou-se a ASP-AT com os lipossomos.

[000103] A enzima não ligada foi separada por diluição com o tampão citrato 10 mM + NaCl 140 mM, pH 6 e ultracentrifugação a 49000 x g. Atendendo aos elevados valores de rendimento obtidos, aproximadamente 100%, e comparado com os valores obtidos para a ligação da superóxido dismutase em formulação semelhante (Corvo et al, 2015), procedeu-se a uma purificação extra por cromatografia no sentido de se apurar se toda a enzima estava efetivamente ligada ou só adsorvida à superfície dos lipossomos. Os ASP-enzimossomos foram recolhidos no volume morto da coluna facilmente visualizados pela turbidez apresentada.

[000104] Os dados referentes à caracterização dos ASP-enzimossomos são apresentados na Tabela 1. O percentual de ligação da ASP-AT à extremidade PEG dos lipossomos, de aproximadamente 93%, é bastante alto, indicando uma grande eficiência no procedimento de ligação.

[000105] A retenção de atividade enzimática situou-se por volta de 48%, o que indica que uma parte da enzima ligada ao enzimosomo foi inativada durante o processo ou que o procedimento de modificação da asparaginase pelo reagente SATA modificou a superfície da enzima a ponto de alterar a atividade

enzimática.

Tabela 1. Sumário da caracterização dos ASP-enzimossomos. Os valores representam a média e desvio padrão de experimentos independentes.

Característica	Lipossomo*	ASP-Enzimossomo
Razão Proteína/Lipídio final ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)	-	$70,8 \pm 5,3$
% de ligação da ASP aos lipossomos**	-	$93,5 \pm 6,5$
% de retenção de atividade enzimática	-	$47,6 \pm 5,0$
Rendimento Lipídico (%)	-	$60,3 \pm 9,6$
Potencial Zeta (mV) a pH 6,0	-3,09	$-8,8 \pm 1,8$
Tamanho (μm)	0,143	$0,165 \pm 0,005$
Índice de Polidispersão (PDI)	0,055	$0,122 \pm 0,023$

* Lipossomos antes da conjugação com a L-asparaginase.

** Calculado em relação ao teórico no momento anterior à incubação da asparaginase com os lipossomos.

[000106] Dado ao valor de 93% de ligação da asparaginase aos lipossomos e no intuito de se estudar possíveis variáveis na purificação pela coluna Sephadex G-200, realizou-se uma incubação da asparaginase modificada pelo SATA e dos lipossomos sem a presença do DSPE-maleimido-PEG para avaliar se a proteína adsorvida, ou seja, não ligada covalentemente, era separada pelo processo cromatográfico. O perfil de purificação está apresentado na Figura 2.

[000107] Através do perfil cromatográfico, conclui-se que a massa de enzima que não está fortemente ligada a porção lipídica é eluída após a fração correspondente a 7mL (Figura 2), para a qual a concentração de lipídeos é muito baixa (medida pela turbidez a 450nm), indicando que a purificação por este método é eficiente no que tange a separar a massa de asparaginase não ligada covalentemente aos enzimossomos.

[000108] Com relação ao tamanho das partículas, observa-se um pequeno

aumento, de 0,143 para 0,165 μ m, após a conjugação dos lipossomos com a asparaginase, com índice de polidispersão na faixa de 0,122. Observa-se ainda que a enzima conferiu carga negativa à partícula (potencial zeta de -8,8); porém, sendo esta uma formulação que contém PEG em sua superfície, é esperado que estes grupamentos mascarem a carga negativa por promover a presença de uma esfera de hidratação, que é justamente o que dificulta o reconhecimento deste tipo de construção pelo sistema imune.

EXEMPLO 4: Preparação dos lipossomos com asparaginases incorporadas no interior.

[000109] Essa construção foi preparada por encapsulação da asparaginase (na sua forma nativa) no espaço interno aquoso do lipossomo. A composição lipídica foi Egg-PC: Chol: DSPE-PEG na razão molar de (68,25: 30,5: 1,25) e a concentração lipídica inicial de 32 μ mol/mL. Os lipossomos foram preparados pelo método de desidratação-reidratação (sDRV) seguido de extrusão para o seu dimensionamento tal como descrito por Corvo et al (2002; 2015). Desta forma, os sDRV obtidos foram dimensionadas através do processo de extrusão (Lipex Thermobarrel Extruder), por filtros com diâmetro de poro decrescente de 0,6, 0,4, 0,2 e 0,1 μ m (Nucleopore® Track-Etched Membranes, Whatman®, EUA). A proteína não encapsulada foi separada por ultracentrifugação e coluna de exclusão molecular Sephadex G-200. A caracterização dos lipossomos incorporadas no espaço interno aquoso é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2: Sumário da caracterização dos lipossomas incorporadas no espaço interno aquoso (ASP-lipossomos).

Característica	ASP-Lipossomo
Razão Proteína/Lipídio final (μ g/ μ mol)	5,9
% de incorporação da ASP aos lipossomos*	16,2

% de retenção de atividade enzimática	100
Rendimento Lipídico (%)	75,3
Potencial Zeta (mV) a pH 6,0	-1,97
Tamanho (µm)	0,140
Índice de Polidispersão (PDI)	0,078

* Calculado em relação ao teórico no momento anterior à incubação da asparaginase com os lipossomos.

EXEMPLO 5: Ensaio de atividade antiproliferativa em células leucêmicas.

[000110] Testou-se a capacidade antiproliferativa das formulações lipossomais contra as linhagens celulares: K562 (leucemia mielóide crônica), Jurkat (leucemia linfocítica aguda), MCF-7 (tumor de mama pouco invasivo) e H69 (metastática de pulmão). Usou-se como comparador a asparaginase de *S. cerevisiae* clonada e expressa em *P. pastoris* livre (não formulada) e a asparaginase de *E. coli* comercial (Aginasa®).

[000111] Os ensaios foram realizados segundo o protocolo do MTS da seguinte forma: as células foram mantidas em fase exponencial de crescimento e então foram semeadas em placas de 96 poços, na proporção aproximada de $2,5 \times 10^3$ células por poço. Em seguida, as células foram tratadas com as duas formulações desenvolvidas de asparaginase, assim como pela asparaginase livre e pela asparaginase de *E. coli* comercial (0,08 a 10 UI/mL), incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após o tempo de 48 ou 72 horas, adicionou-se o reagente de MTS e as placas foram incubadas a 37°C por 2 horas, lendo-se em seguida a absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 630 nm.

5.1. Células H69 (metastática de pulmão)

[000112] Para as células H69, não foram observadas diferenças de crescimento entre o controle negativo (salina) e as células tratadas com asparaginase, indicando que esta linhagem não é sensível a esta enzima (dados

não apresentados).

5.2. Células Jurkat (leucemia linfocítica aguda)

[000113] Com relação à linhagem Jurkat, sensível a asparaginase, os perfis obtidos com 48 e 72h de tratamento estão apresentados nas Figuras 3 e 4. O ensaio feito por 72h apresentou valores maiores de inibição, indicando que as células necessitam de um tempo maior de privação de asparagina para morrer. Observa-se também que os ASP-enzimossomos apresentaram uma resposta similar à da asparaginase livre em 48h e superior em 72h; o que é um bom indicativo da capacidade terapêutica desta formulação. Outro ponto a se ressaltar é que a resposta antiproliferativa do ASP-enzimossomo, apesar de inferior à da asparaginase de *E. coli* em 48h, foi similar em 72h, indicando uma equivalência em termos de propriedades terapêuticas para tempos prolongados.

5.3. Células K562 (leucemia mielóide crônica)

[000114] Com relação à linhagem K562 (Figura 5 e 6), similarmente à resposta antiproliferativa obtida com a linhagem Jurkat, os resultados de 72h de ensaio são mais expressivos do que os obtidos com 48h e os valores de inibição para os ASP-enzimossomos e a asparaginase livre são similares. Entretanto, a resposta antiproliferativa da asparaginase comercial (medicamento Aginasa) foi consideravelmente superior à obtida para a asparaginase de levedura livre e para o ASP-enzimossomo. Este fato pode ser atribuído à capacidade da enzima comercial de hidrolisar também a L-glutamina, o que para algumas linhagens menos sensíveis somente à depleção da L-asparagina, como é o caso da K562, é consideravelmente significativo. De acordo com Pinheiro (2015) a asparaginase II de *S. cerevisiae* clonada e expressa em *P. Pastoris* apresenta baixa especificidade para glutamina.

EXEMPLO 6: Ensaios de estabilidade das formulações

[000115] O estudo de estabilidade das formulações em suspensão a 4°C foi feito pela avaliação dos seguintes parâmetros: quantidade de enzima e

lipídeo e retenção de atividade enzimática.

[000116] O estudo da estabilidade foi feito pela comparação dos enzimosomas com construções nas quais a enzima com atividade asparaginase foi incorporada no interior de lipossomos, conforme descrito no EXEMPLO 4.

6.1. Ensaio de estabilidade

[000117] A estabilidade dos ASP-enzimosomas e dos ASP-lipossomos a 4°C por 37 dias e 42 dias, respectivamente, foi avaliada segundo a manutenção da razão proteína/lipídio. Este parâmetro foi ligeiramente alterado, mantendo 79 e 80% do valor inicial para os ASP-enzimosomas e ASP-lipossomos, respectivamente, indicando que as construções apresentam estabilidade relativamente elevada.

6.2. Ensaio de manutenção da atividade enzimática

[000118] Com relação à manutenção da atividade enzimática, verifica-se por meio das Figuras 8 e 9 que a construção do tipo enzimosomo apresentou estabilidade muito maior do que uma do tipo lipossomo com asparaginase encapsulada no espaço interno aquoso, à 4°C. O ASP-enzimosomo manteve-se estável, sem perda significativa de atividade por 4 dias e manteve aproximadamente 82% da atividade após 37 dias em geladeira. Estes resultados indicam que esta formulação é suficientemente estável, fator preponderante para um biofármaco.

EXEMPLO 7: Comparação entre o enzimosomo da presente invenção e o estado da técnica

[000119] Na tabela 3 são demonstrados os parâmetros diferenciados entre o enzimosomo do estado da técnica, relacionado à enzima superóxido dismutase, e o enzimosomo da presente invenção.

Tabela 3: Comparação entre parâmetros do enzimosomo da presente invenção e o estado da técnica

Enzima	Razão molar reagente SATA : Enzima	Extrusão (tamanho de partícula)	Razão molar Maleimido-PEG-PE : Enzima
Superóxido Dismutase	4:1	Até 50 nm	10:1
Asparaginase	22:1	140 nm	40:1

[000120] Na etapa de ativação da enzima por tiolação utilizando o reagente SATA, foi utilizada, para a asparaginase, a razão molar SATA:enzima de aproximadamente 22:1, enquanto que para a Superóxido Dismutase, este valor foi de 4:1. Verifica-se então que a razão molar reagente SATA:Enzima é muito maior para a asparaginase.

[000121] O tamanho da partícula, definido pelo tamanho do diâmetro do poro do filtro utilizado na etapa de extrusão, também foi muito diferente para as duas enzimas: 0,140 nm para a asparaginase e de até 50 nm para a Superóxido Dismutase.

[000122] A razão molar Maleimido-PEG-PE:Enzima foi muito maior para a asparaginase (40:1) quando comparado à razão empregada para a Superóxido Dismutase (10:1).

REFERÊNCIAS

- CORVO, M.L.; MARINHO, H.S., MARCELINO, P.; LOPES, R.M.; VALE, C.A.; MARQUES, C.R.; MARTINS, L.C.D.; LAVERMAN, P.; STORM, G.; MARTINS, M.B.A.F. Superoxide Dismutase Enzymosomes: Carrier Capacity Optimization, in Vivo Behaviour and Therapeutic Activity, *Pharmacology Research*, 32, 91-102, 2015.
- FERRARA, M.A.; SEVERINO, N. M. B.; MANSURE, J.J.; MARTINS, A. S.; OLIVEIRA, E. M. M.; SIANI, A.C.; PEREIRA JR, N, TORRES, F.A.G.; BON, E.P.S. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris*

- strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1457-1463. 2006.
- FERRARA, M.A.; SEVERINO, N.M.B.; VALENTE, R.H.; PERALES, J.; BON, E.P.S. High-yield extraction of periplasmic asparaginase produced by recombinant *Pichia pastoris* harbouring the *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. *Enzyme and Microbial Technology*, 47, 71-76, 2010.
- GIRÃO, L.F.C.; ROCHA, S.L.G.; TEIXEIRA, R.S.S.; BOM, A.P.A.; SAMPAIO, A.L.F.; SILVA, J.G.; FERRARA, M.A.; BON, E.P.S.; PERALES, J. *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II, a potential antileukaemic drug: purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, v. 120, p. 118-125, 2016.
- MÜLLER H.J, BOOS J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hemat.*, 28, 97-113. 1998.
- PINHEIRO, A.M.S. Avaliação das propriedades bioquímicas, físico-químicas e antileucêmica da enzima asparaginase produzida por *Pichia pastoris* recombinante. Dissertação de mestrado. Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, Farmanguinhos, FIOCRUZ. 2015.
- VALE, CA, CORVO, ML, MARTINS, LCD, MARQUES C, CRUZ, MEM, MARTINS, MB. Construction of enzymosomes: Optimization of coupling parameters. *Technical Proceedings of the 2006 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show*, Vol. 2, Chapter 5, 396-397. 2006.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação lipossomal, caracterizada pelo fato de que compreende enzimas com atividade asparaginase ligadas às extremidades de moléculas de polietileno glicol expostas na superfície de lipossomos.

2. Formulação lipossomal de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo fato de que as moléculas de polietileno glicol são funcionalizadas.

3. Formulação lipossomal de acordo com a reivindicação 1 ou 2 caracterizada pelo fato de que a composição lipídica do lipossomo é fosfatidilcolina de ovo (Egg-PC): colesterol (Chol) : maleimido-polietileno glicol-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (Maleimido-PEG-DSPE) : polietileno glicol-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (PEG-DSPE).

4. Formulação lipossomal de acordo com a reivindicação 3 caracterizada pelo fato de que a proporção entre Egg-PC : Chol : Maleimido-PEG-DSPE : PEG-DSPE é de 68,25 : 30,5 : 0,75 : 0,50.

5. Formulação de acordo com a reivindicação 3 ou 4 caracterizada pelo fato de que a razão molar Maleimido-PEG-DSPE : enzima com atividade asparaginase é de 20:1 a 60:1.

6. Formulação lipossomal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 caracterizada pelo fato de que a concentração lipídica inicial do lipossomo é de 5 a 35 $\mu\text{mol/mL}$.

7. Formulação lipossomal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 caracterizada pelo fato de que a enzima com atividade asparaginase é asparaginase II da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

8. Formulação lipossomal de acordo com a reivindicação 7 caracterizada pelo fato de que a asparaginase é codificada pelo gene *ASP3*.

9. Formulação lipossomal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 caracterizada pelo fato de que a enzima com atividade asparaginase é ligada à extremidade da molécula de polietileno glicol

funcionalizada por meio de ligação covalente.

10. Formulação lipossomal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de câncer.

11. Formulação lipossomal de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o câncer é leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crônica ou linfomas não Hodgkin.

12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a formulação lipossomal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

13. Uso de uma formulação lipossomal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 caracterizado pelo fato de que é para produção de um medicamento para tratamento de câncer.

14. Uso de acordo com a reivindicação 13 caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crônica ou linfomas não Hodgkin.

15. Método para tratamento de câncer caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma formulação lipossomal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 a um indivíduo em necessidade do mesmo.

16. Método de acordo com a reivindicação 15 caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crônica ou linfomas não Hodgkin.

17. Processo para preparação de uma formulação lipossomal como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- introdução de grupos reativos na enzima com atividade asparaginase por ligação a cadeia lateral das lisinas expostas a

superfície da asparaginase, deixando as extremidades tioladas;

- ativação da enzima com atividade asparaginase tiolada; e
- ligação da enzima com atividade asparaginase ativada ao lipossomo.

18. Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a enzima com atividade asparaginase é produzida de forma recombinante em *P. pastoris*.

19. Processo de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que a introdução de grupos reativos por tiolação é feita utilizando o reagente bifuncional N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA).

20. Processo de acordo com a reivindicação 19 caracterizado pelo fato de que a razão molar SATA : enzima com atividade asparaginase é de 18:1 a 24:1.

21. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 20 caracterizado pelo fato de que a ativação da enzima com atividade asparaginase tiolada é feita por desacetilação na presença de hidroxilamina.

22. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 21 caracterizado pelo fato de que ligação da enzima com atividade asparaginase ativada ao lipossomo é feita pela ligação covalente da enzima com atividade asparaginase ativada à extremidade da molécula de polietileno glicol funcionalizada exposta na superfície do lipossomo.

23. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 22 caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de separação da enzima com atividade asparaginase ligada ao lipossomo da enzima com atividade asparaginase não ligada.

24. Processo de acordo com a reivindicação 23 caracterizado pelo fato de que a separação é feita por ultracentrifugação.

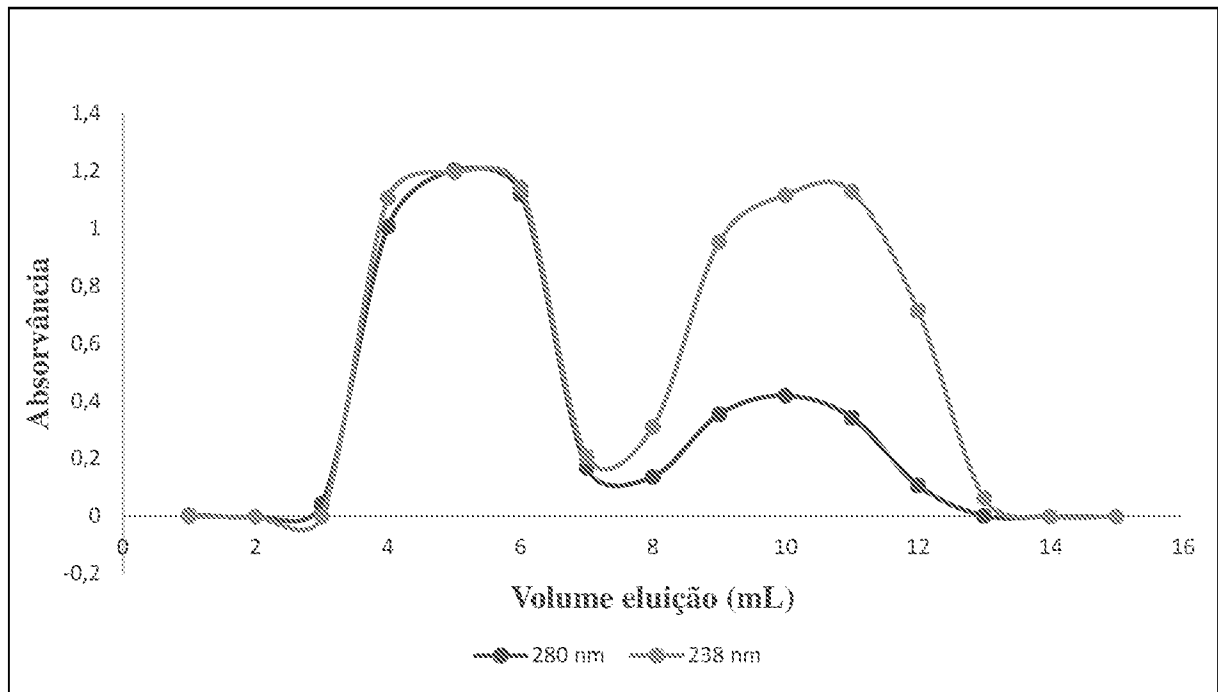


FIGURA 1

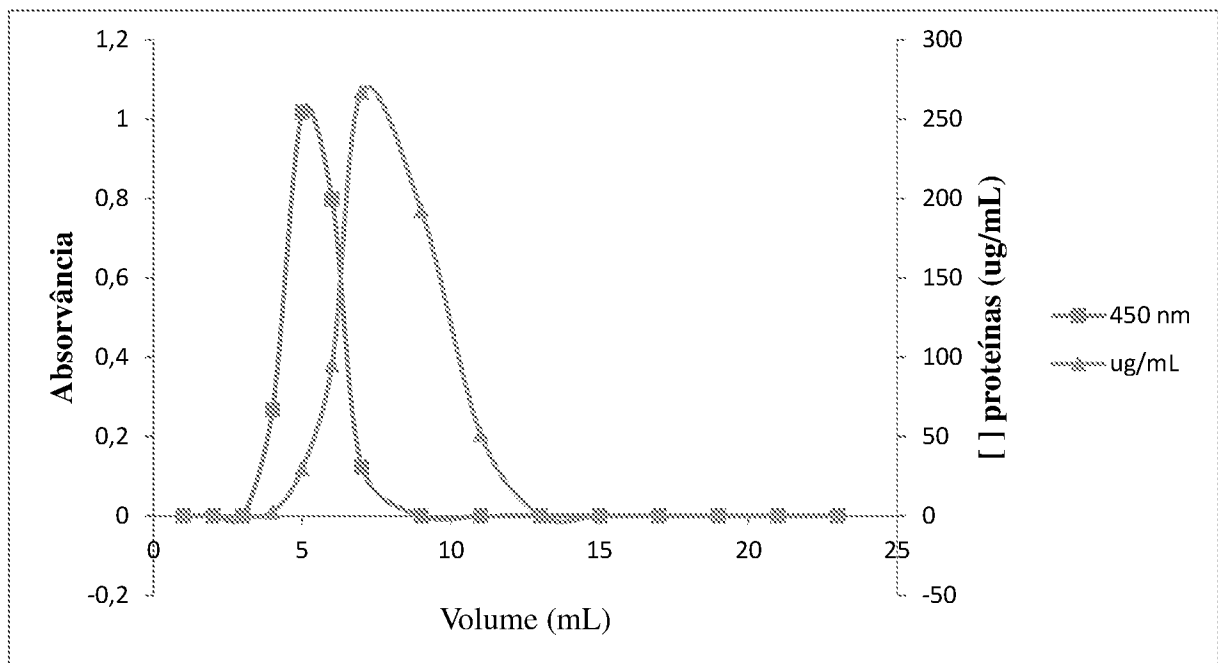


FIGURA 2

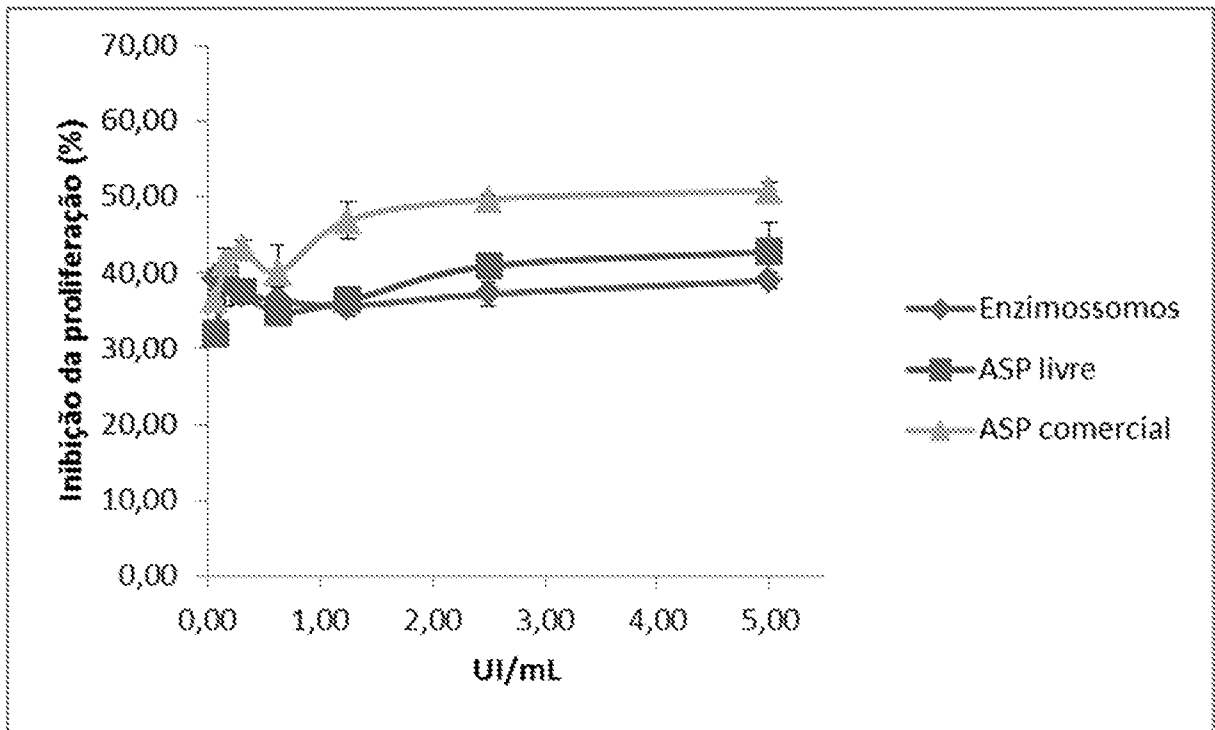


FIGURA 3

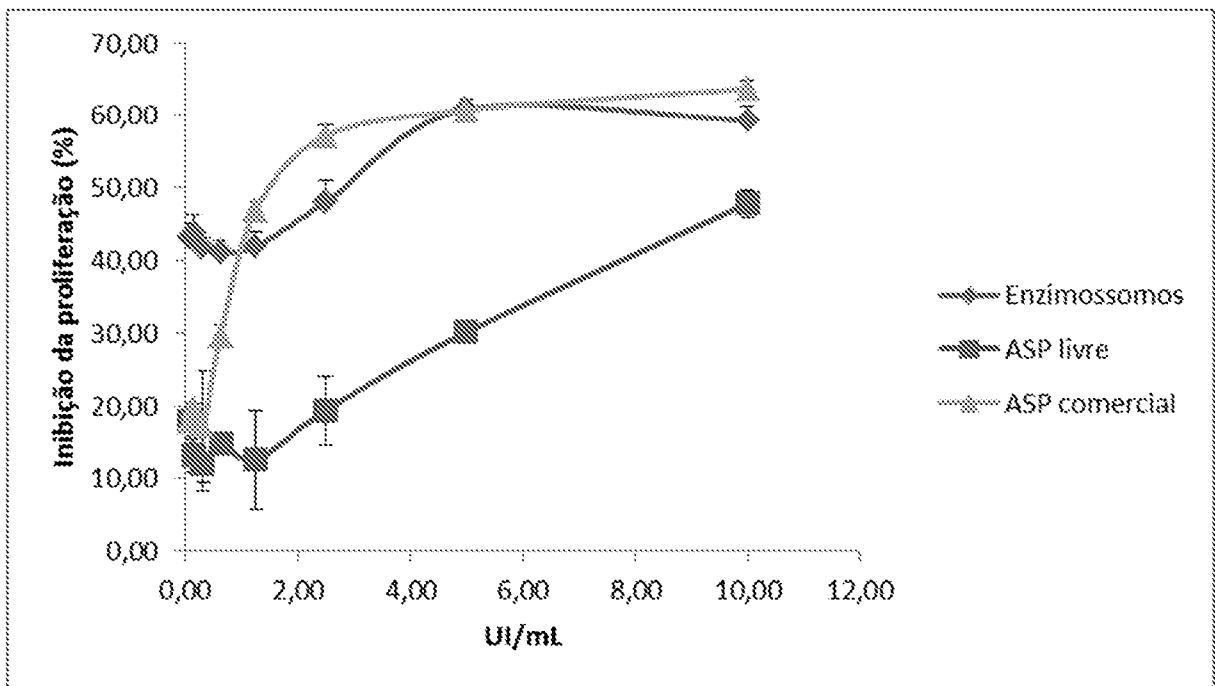


FIGURA 4

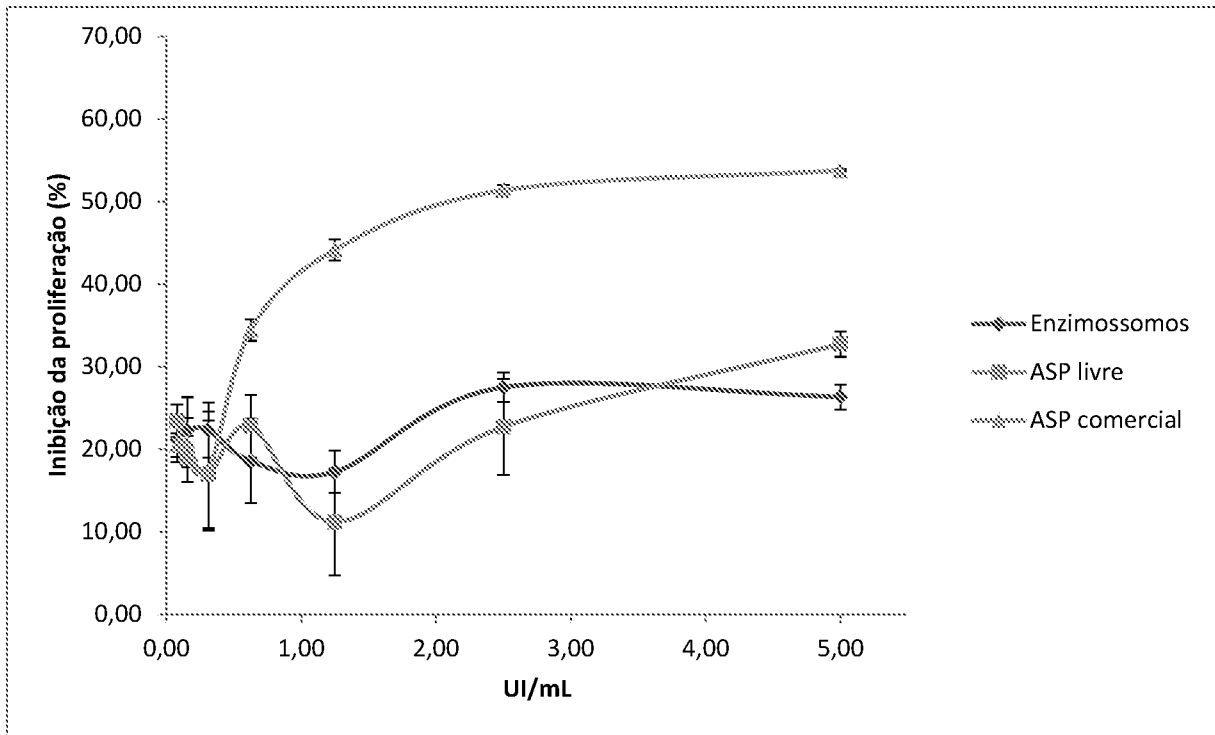


FIGURA 5

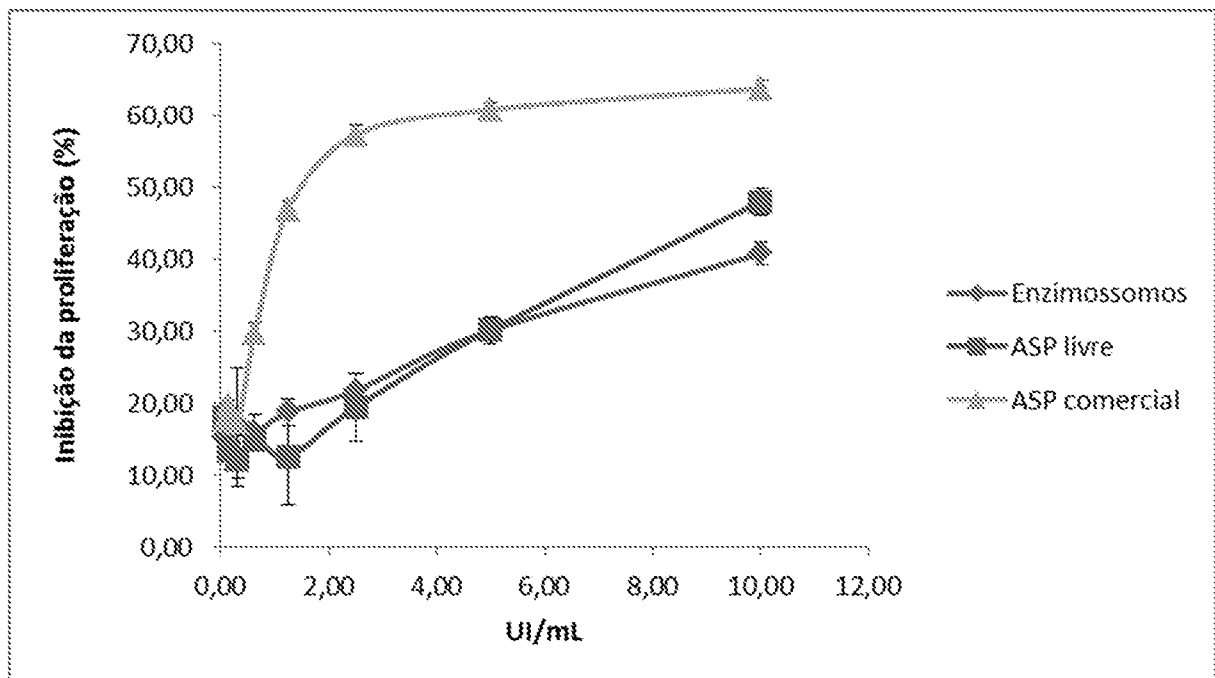


FIGURA 6

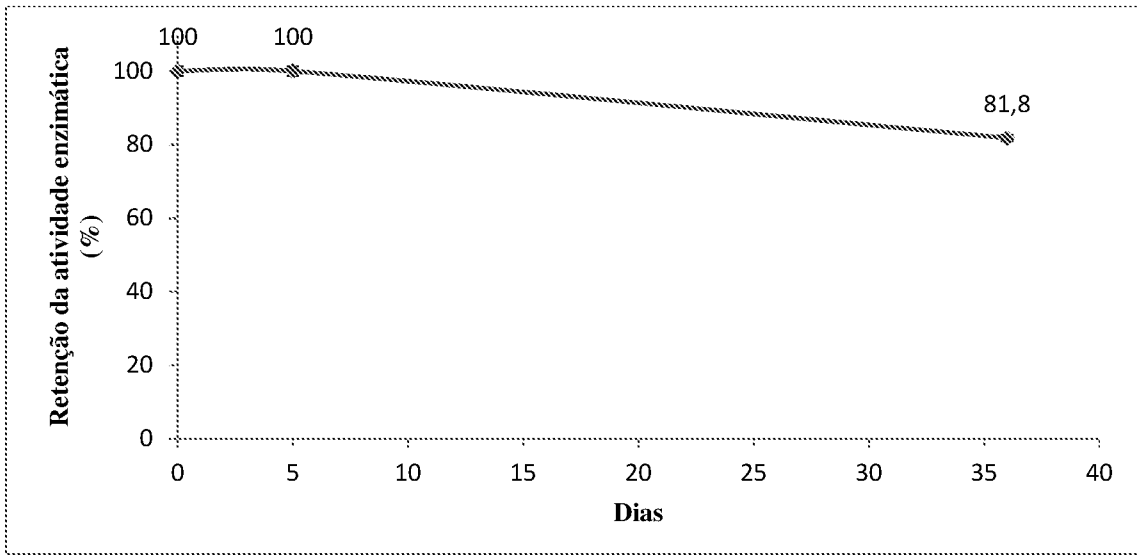


FIGURA 7

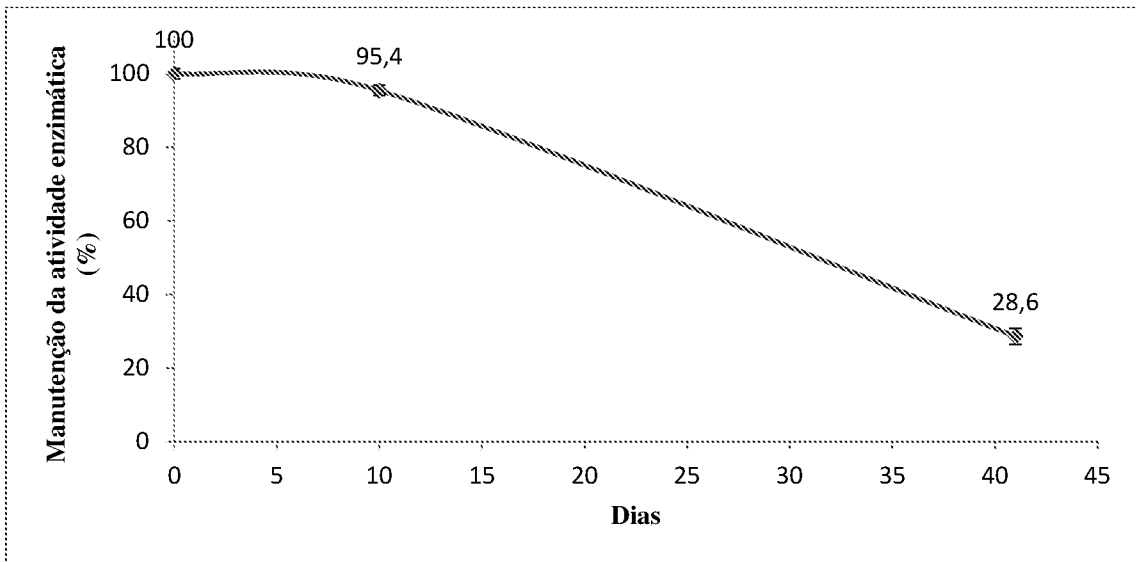


FIGURA 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2019/050419

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 38/50 (2006.01), A61K 9/127 (2006.01), A61K 47/60 (2017.01), A61K 47/69 (2017.01), A61P 35/00 (2006.01), A61P 35/02 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 38, A61K 9, A61K 47, A61K 47, A61P 35, A61P 35		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SINPI- Banco de dados INPI-BR; Periódicos Capes		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) ESPACENET; GOOGLE PATENTS; REGISTRY e CAPLUS (STN).		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9621469 A1 (SHEARWATER POLYMERS INC [US]) 18 July 1996 (1996-07-18) See the whole document, particularly p. 8, l. 18; p. 18, l. 20-24; p. 56, l. 32-36; p. 58, l. 8-17; p. 59, l. 1-7, 29-36; p. 63, l. 15-25; p. 64, l. 31-35; p. 65, l. 1 a p. 66, l. 2; p. 14, l. 19-33; p. 45, l. 22-32; p. 67, l. 4-6.	1-14, 17-24
A	FONTES, F. S. P. S. Efeito da Administração de Enzimosomas de Superóxido Dismutase na Lesão de Reperfusão do Fígado. Estudos num Modelo Animal de Isquémia/ Reperfusão. 2012. 131 f. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestrado em Química. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. See the whole document, particularly the abstract	1-14, 17-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 14 November 2019	Date of mailing of the international search report 30 November 2019	
Name and mailing address of the ISA/ INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Rua Mayrink Veiga nº 9, 6º andar cep: 20090-910, Centro - Rio de Janeiro/RJ	Authorized officer Rodinelli Borges de Oliveira +55 21 3037-3493/3742	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2019/050419

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HOLOVANCHUK, D. Otimização do direcionamento para células tumorais de nanosistemas lipídicos para uso terapêutico. 2014. 149 f. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestrado em Bioquímica. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.</p> <p>See the whole document.</p> <p>-----</p>	1-14, 17-24
A	<p>GASPAR, M.M. <i>et al.</i> Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations. <i>Cancer Chemother Pharmacol</i> (1996) 38: 373—377.</p> <p>See the whole document, particularly the abstract.</p> <p>-----</p>	1-14, 17-24
A	<p>CRUZ, M. E. M.. <i>et al.</i> Native and lipophilic derivatives of asparaginase and superoxide dismutase and respective liposomal forms. <i>Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials</i> (1994), 21ST, 346-347.</p> <p>See the whole document.</p> <p>-----</p>	1-14, 17-24
A	<p>CRUZ, M. E. M.. <i>et al.</i> Liposomal L-asparaginase: in vitro evaluation. <i>International Journal of Pharmaceutics</i>, 96 (1993) 67-77.</p> <p>See the whole document.</p> <p>-----</p>	1-14, 17-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2019/050419

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.: **15-16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 15 and 16 contain matter that is subject to the requirements of PCT Rule 39.1(iv) regarding methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest


- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2019/050419

WO 9621469 A1	1996-07-18	AU 4755596 A	1996-07-31
		US 5932462 A	1999-08-03
		US 2005090650 A1	2005-04-28
		US 7419600 B2	2008-09-02
		US 2009054590 A1	2009-02-26
		US 7786221 B2	2010-08-31
		US 2010298496 A1	2010-11-25
		US 8354477 B2	2013-01-15
		US 2013177961 A1	2013-07-11
		US 8546493 B2	2013-10-01
		US 2001007765 A1	2001-07-12
		US 2003114647 A1	2003-06-19
-----	-----	-----	-----

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO		
A61K 38/50 (2006.01), A61K 9/127 (2006.01), A61K 47/60 (2017.01), A61K 47/69 (2017.01), A61P 35/00 (2006.01), A61P 35/02 (2006.01)		
De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC		
B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA		
Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)		
A61K 38, A61K 9, A61K 47, A61K 47, A61P 35, A61P 35		
Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados		
SINPI- Banco de dados INPI-BR; Periódicos Capes		
Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)		
ESPACENET; GOOGLE PATENTS; REGISTRY e CAPLUS (STN).		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
A	WO 9621469 A1 (SHEARWATER POLYMERS INC [US]) 18 julho 1996 (1996-07-18) Ver todo o documento, em especial ver p. 8, l. 18; p. 18, l. 20-24; p. 56, l. 32-36; p. 58, l. 8-17; p. 59, l. 1-7, 29-36; p. 63, l. 15-25; p. 64, l. 31-35; p. 65, l. 1 a p. 66, l. 2; p. 14, l. 19-33; p. 45, l. 22-32; p. 67, l. 4-6.	1-14, 17-24
A	----- FONTES, F. S. P. S. Efeito da Administração de Enzimosomas de Superóxido Dismutase na Lesão de Reperfusão do Fígado. Estudos num Modelo Animal de Isquemia/ Reperfusão. 2012. 131 f. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestrado em Química. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Ver todo o documento, em especial o resumo. -----	1-14, 17-24
<input checked="" type="checkbox"/> Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C <input checked="" type="checkbox"/> Ver o anexo de famílias das patentes		
* Categorias especiais dos documentos citados:		
"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.		
"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional		
"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial		
"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.		
"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.		
"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.		
"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.		
"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.		
"&" documento membro da mesma família de patentes.		
Data da conclusão da pesquisa internacional		Data do envio do relatório de pesquisa internacional:
14/11/2019		30/11/2019
Nome e endereço postal da ISA/BR		Funcionário autorizado
 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Rua Marquês de Pombal nº 9, 6º andar cep: 20090-910, Centro - Rio de Janeiro/RJ +55 21 3037-3663		Rodinelli Borges de Oliveira
Nº de fax:		Nº de telefone: +55 21 3037-3493/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
A	<p>HOLOVANCHUK, D. Otimização do direcionamento para células tumorais de nanosistemas lipídicos para uso terapêutico. 2014. 149 f. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestrado em Bioquímica. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.</p> <p>Ver todo o documento.</p> <p>-----</p>	1-14, 17-24
A	<p>GASPAR, M.M. <i>et al.</i> Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations. <i>Cancer Chemother Pharmacol</i> (1996) 38: 373—377.</p> <p>Ver todo o documento, em especial o resumo.</p> <p>-----</p>	1-14, 17-24
A	<p>CRUZ, M. E. M.. <i>et al.</i> Native and lipophilic derivatives of asparaginase and superoxide dismutase and respective liposomal forms. <i>Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials</i> (1994), 21ST, 346-347.</p> <p>Ver todo o documento.</p> <p>-----</p>	1-14, 17-24
A	<p>CRUZ, M. E. M.. <i>et al.</i> Liposomal L-asparaginase: in vitro evaluation. <i>International Journal of Pharmaceutics</i>, 96 (1993) 67-77.</p> <p>Ver todo o documento.</p> <p>-----</p>	1-14, 17-24

Quadro II Observações quando certas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa (Continuação do ponto 2 da primeira página)

Este relatório de pesquisa internacional não foi formulado em relação a certas reivindicações, sob Artigo 17.2).a), pelas seguintes razões:

1. Reivindicações: 15-16

porque estas se referem a matéria na qual esta Autoridade não está obrigada a realizar a pesquisa, a saber:

As reivindicações 15 e 16 contêm matéria incursa nas disposições da Regra 39.1 (iv) PCT, sobre métodos de tratamento cirúrgico ou terapêutico do corpo humano ou animal.

2. Reivindicações:

porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa significativa, especificamente:

3. Reivindicações:

porque estas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com a segunda e terceira frase da Regra 6.4.a).

Quadro III Observações por falta de unidade de invenção (Continuação do ponto 3 da primeira página)

Esta Autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste depósito internacional, a saber:

1. como todas as taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa cobre todas as reivindicações pesquisáveis.

2. como a pesquisa em todas as reivindicações pesquisáveis pode ser feita sem esforço que justifique pagamento adicional, esta Autoridade não solicitou o pagamento de taxas adicionais.

3. como somente algumas das taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa internacional cobre somente aquelas reivindicações cujas taxas foram pagas, especificamente as reivindicações:

4. as taxas de pesquisas adicionais requeridas não foram pagas dentro do prazo pelo depositante. Conseqüentemente, este relatório de pesquisa internacional se limita à invenção mencionada primeiramente nas reivindicações, na qual é coberta pelas reivindicações:

Observações da reclamação

as taxas adicionais para pesquisas foram acompanhadas pela reclamação do depositante e, se for o caso, pelo pagamento da taxa de reclamação.

as taxas adicionais para pesquisa foram acompanhadas pela reclamação do depositante mas a taxa de reclamação não foi paga dentro do prazo especificado pela solicitação.

o pagamento de pesquisas adicionais não acompanha nenhuma reclamação.

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
Informação relativa a membros da família de patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2019/050419

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 9621469 A1	1996-07-18	AU 4755596 A	1996-07-31
		US 5932462 A	1999-08-03
		US 2005090650 A1	2005-04-28
		US 7419600 B2	2008-09-02
		US 2009054590 A1	2009-02-26
		US 7786221 B2	2010-08-31
		US 2010298496 A1	2010-11-25
		US 8354477 B2	2013-01-15
		US 2013177961 A1	2013-07-11
		US 8546493 B2	2013-10-01
		US 2001007765 A1	2001-07-12
		US 2003114647 A1	2003-06-19
-----	-----	-----	-----