



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

(21) BR 112020008404-2 A2



(22) Data do Depósito: 31/10/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 03/11/2020

(54) **Título:** NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA A ENTREGA DE RNA MODIFICADO CODIFICANDO UM POLIPEPTÍDEO VEGF-A

(51) **Int. Cl.:** A61K 9/00; A61K 9/127; A61K 48/00; A61K 38/18.

(30) **Prioridade Unionista:** 31/10/2017 US 62/579,671.

(71) **Depositante(es):** MODERNATX, INC..

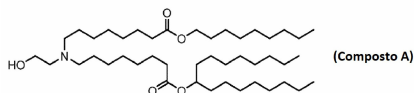
(72) **Inventor(es):** KENNY MIKAEL HANSSON; KERRY BENENATO; MARIA WAGBERG; ANNIKA PALSSON; REGINA FRITSCHÉ-DANIELSON.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018058541 de 31/10/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/089818 de 09/05/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 28/04/2020

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a nanopartículas compreendendo um componente lipídico e um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A. Aspectos da descrição referem-se ainda a usos de nanopartículas compreendendo um componente lipídico e um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A para melhorar a cicatrização de feridas em um sujeito.



Relatório descritivo da patente de invenção para **“NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA A ENTREGA DE RNA MODIFICADO CODIFICANDO UM POLIPEPTÍDEO VEGF-A”**.

1. REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório dos EUA N.º 62/579,671, registrado em 31 de outubro, 2017, cujos conteúdo completo é no presente documento incorporado por referência.

2. LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e que é deste modo incorporada por referência na sua totalidade. A referida cópia ASCII, criada a 31 de outubro de 2018, é denominada 09963_0092-00304_SL.txt e tem 11 396 bytes de tamanho.

3. CAMPO

[0003] A presente invenção refere-se a nanopartículas compreendendo um componente lipídico e um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A. Aspectos da descrição referem-se ainda a usos de nanopartículas compreendendo um componente lipídico e um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A para melhorar a cicatrização de feridas em um sujeito.

4. ANTECEDENTES

[0004] As vias do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) desempenham um papel central no processo de cicatrização de feridas, incluindo a revascularização de tecidos danificados, melhorando a permeabilidade vascular e a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Ainda é um desafio a entrega de agentes para aumentar as vias de VEGF-A para possíveis efeitos terapêuticos, tal como melhorar a cicatrização de feridas em um sujeito.

[0005] Tem sido tentado um número diverso de métodos para permitir abordagens clinicamente tratáveis para aumentar as proteínas

VEGF-A em tecidos alvo. No entanto, cada uma das abordagens apresenta desvantagens significativas. Por exemplo, a entrega de proteína sistêmica de VEGF-A pode resultar em hipotensão significativa e o VEGF-A é rapidamente degradado. Plasmídeos virais de DNA de VEGF-A encapsulados ou nus têm limitado o controle temporal da expressão proteica e a eficiência da expressão *in vivo* pode ser altamente variável e não dependente da dose. Como resultado, essas limitações restringiram a aplicabilidade de aumentar os níveis de VEGF-A como agente terapêutico.

[0006] Outro desenvolvimento recente é o fornecimento de RNA terapêuticos codificando proteínas VEGF-A. No entanto, a entrega de RNA naturais às células pode ser desafiadora devido à instabilidade relativa e à baixa permeabilidade celular dessas moléculas de RNA. Além disso, os RNA naturais podem desencadear a ativação imune (ver, por exemplo, Kaczmarek et al., "Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality," *Genome Med.*, 2017, 9: 60), que limitam seus usos para entregar proteínas VEGF-A a tecidos alvo.

[0007] Por conseguinte, permanece a necessidade de composições que permitam a entrega eficaz e segura de RNA codificando proteínas VEGF-A. Além disso, continua a haver necessidade de métodos alternativos para aumentar as vias de VEGF-A para efeitos terapêuticos potenciais, tal como melhorar a cicatrização de feridas em um sujeito.

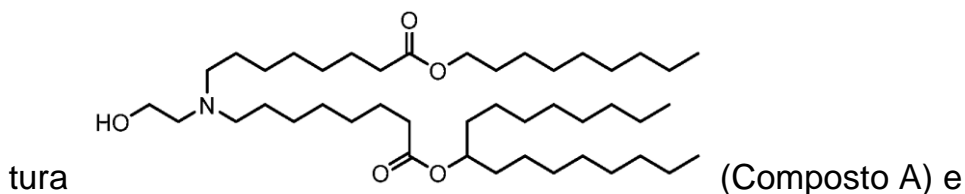
5. SUMÁRIO

[0008] A presente invenção refere-se a nanopartículas compreendendo um componente lipídico e um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A. Aspectos da descrição referem-se ainda a usos de nanopartículas compreendendo um componente lipídico e um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A para melhorar a cicatrização de feridas em um sujeito.

[0009] Certas modalidades da presente descrição estão sumariadas nos parágrafos que se seguem. Esta lista é apenas exemplificativa e não exaustiva de todas as modalidades fornecidas por esta descrição.

[0010] Modalidade 1. Uma nanopartícula compreendendo

(i) um componente lipídico compreendendo um composto tendo a estrutura



(ii) um RNA modificado compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 e 3-5, codificando um polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2.

[0011] Modalidade 2. A nanopartícula da modalidade 1, em que o componente lipídico compreende ainda um fosfolípídeo, um lipídeo estrutural e/ou um lipídeo PEG.

[0012] Modalidade 3. A nanopartícula da modalidade 2, em que o fosfolípídeo é selecionado do grupo consistindo em 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diundecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0 Diéter PC), 1-oleoil-2-colesteril-hemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemsPC), 1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 Liso PC), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16,0 PE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sódio

(DOPG), esfingomiéline e suas misturas;

o lipídeo estrutural é selecionado do grupo consistindo em colesterol, fecosterol, sitosterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, tomatidina, ácido ursólico, alfa-tocoferol e suas misturas; e/ou

o lipídeo PEG é selecionado do grupo consistindo em uma fosfatidiletanolamina modificada com PEG, um ácido fosfatídico modificada com PEG, uma ceramida modificada com PEG, uma dialquilamina modificada com PEG, um diacilglicerol modificada com PEG, um dialquilglicerol modificada com PEG e suas misturas.

[0013] Modalidade 4. A nanopartícula da modalidade 1, em que o componente lipídico compreende ainda um fosfolipídeo que é DSPC, um lipídeo estrutural que é colesterol e/ou um lipídeo PEG que é PEG-DMG.

[0014] Modalidade 5. A nanopartícula de acordo com qualquer uma das modalidades 1-4, em que a razão N:P é de cerca de 2:1 a cerca de 30:1.

[0015] Modalidade 6. A nanopartícula de acordo com a modalidade 5, em que a razão N:P é de cerca de 5,67:1.

[0016] Modalidade 7. A nanopartícula de acordo com a modalidade 5, em que a razão N:P é de cerca de 3:1.

[0017] Modalidade 8. A nanopartícula de acordo com qualquer uma das modalidades 1-4, em que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1 a cerca de 100:1.

[0018] Modalidade 9. A nanopartícula da modalidade 8, em que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 20:1.

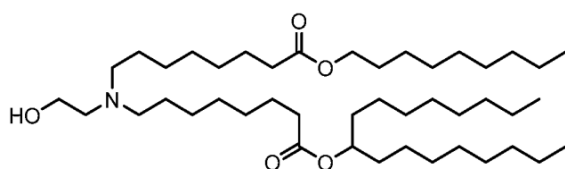
[0019] Modalidade 10. A nanopartícula da modalidade 8, em que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1.

[0020] Modalidade 11. A nanopartícula de acordo com qualquer

uma das modalidades 1-4, em que a nanopartícula tem um diâmetro médio de cerca de 50 nm a 100 nm.

[0021] Modalidade 12. Uma composição farmacêutica compreendendo

(a) pelo menos uma nanopartícula compreendendo (i) um componente lipídico compreendendo um composto com a estrutura



(Composto A) e (ii) um RNA mo-

dificado compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 e 3-5, codificando um polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2; e

b) um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0022] Modalidade 13. A composição farmacêutica da modalidade 12, em que o componente lipídico compreende ainda um fosfolípido, um lipídeo estrutural e/ou um lipídeo PEG.

[0023] Modalidade 14. A composição farmacêutica da modalidade 13, em que o fosfolípido é selecionado do grupo consistindo em 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diundecanoil-sn-glicero-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0 Diéter PC), 1-oleoil-2-colesteril-hemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemsPC), 1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 Liso PC), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16,0 PE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-

fosfoetanolamina, 1,2-dilinoilenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sódio (DOPG), esfingomielina e suas misturas;

o lipídeo estrutural é selecionado do grupo consistindo em colesterol, fecosterol, sitosterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, tomatidina, ácido ursólico, alfa-tocoferol e suas misturas; e/ou

o lipídeo PEG é selecionado do grupo consistindo em uma fosfatidiletanolamina modificada com PEG, um ácido fosfatídico modificado com PEG, uma ceramida modificada com PEG, uma dialquilamina modificada com PEG, um diacilglicerol modificado com PEG, um dialquilglicerol modificado com PEG e suas misturas.

[0024] Modalidade 15. A composição farmacêutica da modalidade 12, em que o componente lipídico compreende ainda um fosfolipídeo que é DSPC, um lipídeo estrutural que é colesterol e/ou um lipídeo PEG que é PEG-DMG.

[0025] Modalidade 16. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das modalidades 12-15, em que a razão N:P é de cerca de 2:1 a cerca de 30:1.

[0026] Modalidade 17. A composição farmacêutica de acordo com a modalidade 16, em que a razão N:P é de cerca de 5,67:1.

[0027] Modalidade 18. A composição farmacêutica de acordo com a modalidade 16, em que a razão N:P é de cerca de 3:1.

[0028] Modalidade 19. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das modalidades 12-18, em que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1 a cerca de 100:1.

[0029] Modalidade 20. A composição farmacêutica da modalidade 19, em que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 20:1.

[0030] Modalidade 21. A composição farmacêutica da modalidade 19, em que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1.

[0031] Modalidade 22. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das modalidades 12-21, em que a nanopartícula tem um diâmetro médio de cerca de 50 nm a 100 nm.

[0032] Modalidade 23. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das modalidades 12-22, em que quando administrada a um tecido de mamífero ou a um sujeito, a composição farmacêutica resulta em uma concentração máxima observada no plasma e/ou tecido, C_{max} , do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 até cerca de 450 pg/mL de plasma ou pg/mg de tecido.

[0033] Modalidade 24. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das modalidades 12-22, em que, quando administrada a um tecido de mamífero ou a um sujeito, a composição farmacêutica resulta em uma área total de plasma e/ou tecido sob a curva de concentração, AUC_{0-t} , do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 até cerca de 5,500 pg*h/mL de plasma ou pg*h/mg de tecido.

[0034] Modalidade 25. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das modalidades 12-22, em que quando administrada a um tecido de mamífero ou a um sujeito, a composição farmacêutica resulta na produção de mais do que cerca de 400 pg/mg de tecido do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 dentro de 8 horas.

[0035] Modalidade 26. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das modalidades 12-22, em que quando administrada a um tecido de mamífero ou a um sujeito, a composição farmacêutica resulta na produção de mais do que cerca de 1 pg/mg de tecido do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 durante até 6 dias.

[0036] Modalidade 27. A composição farmacêutica da modalidade 12, em que o excipiente farmacêuticamente aceitável é escolhido

de um solvente, meios de dispersão, diluente, agente de dispersão, auxiliar de suspensão, tensoativo, agente isotônico, agente espessante ou emulsionante, conservante, polímero, peptídeo, proteína, célula, hialuronidase e suas misturas.

[0037] Modalidade 28. Um método para promover e/ou melhorar a cicatrização de feridas em um sujeito, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz da nanopartícula de acordo com qualquer uma das modalidades 1-11 ou a composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das modalidades 12-27.

[0038] Modalidade 29. O método da modalidade 28, em que o componente lipídico da nanopartícula compreende ainda um fosfolípido, um lipídeo estrutural e um lipídeo PEG.

[0039] Modalidade 30. O método da modalidade 29, em que o fosfolípido é selecionado do grupo consistindo em 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diundecanoil-sn-glicero-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0 Diéter PC), 1-oleoil-2-colesteril-hemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemsPC), 1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 Liso PC), 1,2-dilinolenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16,0 PE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinolenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sódio (DOPG), esfingomielina e suas misturas;

o lipídeo estrutural é selecionado do grupo consistindo em colesterol, fecosterol, sitosterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, tomatidina, ácido ursólico, alfa-tocoferol e suas misturas; e/ou o lipídeo PEG é selecionado do grupo consistindo em uma fosfatidiletanolamina modificada com PEG, um ácido fosfatídico modificado com PEG, uma ceramida modificada com PEG, uma dialquilamina modificada com PEG, um diacilglicerol modificado com PEG, um dialquilglicerol modificado com PEG e suas misturas.

[0040] Modalidade 31. O método da modalidade 28, em que o componente lipídico compreende ainda um fosfolipídeo que é DSPC, um lipídeo estrutural que é colesterol e/ou um lipídeo PEG que é PEG-DMG.

[0041] Modalidade 32. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-31, em que a razão N:P da nanopartícula é de cerca de 2:1 a cerca de 30:1.

[0042] Modalidade 33. O método de acordo com a modalidade 32, em que a razão N:P da nanopartícula é de cerca de 5,67:1.

[0043] Modalidade 34. O método de acordo com a modalidade 32, em que a razão N:P da nanopartícula é de cerca de 3:1.

[0044] Modalidade 35. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-34, em que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1 a cerca de 100:1.

[0045] Modalidade 36. O método da modalidade 35, em que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 20:1.

[0046] Modalidade 37. O método da modalidade 35, em que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1.

[0047] Modalidade 38. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-37, em que a nanopartícula tem um diâmetro médio

de cerca de 70 nm a cerca de 80 nm.

[0048] Modalidade 39. O método da modalidade 38, em que a nanopartícula tem um diâmetro médio de cerca de 72 nm.

[0049] Modalidade 40. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-39, em que a administração resulta em uma concentração máxima observada no plasma e/ou tecido, C_{max} , do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 até cerca de 450 pg/mL de plasma ou pg/mg de tecido.

[0050] Modalidade 41. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-39, em que a administração resulta em uma área total de plasma e/ou tecido sob a curva de concentração, AUC_{0-t} , do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 até cerca de 5,500 pg*h/mL de plasma ou pg*h/mg de tecido.

[0051] Modalidade 42. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-39, em que a administração resulta na produção de mais do que cerca de 400 pg/mg de tecido do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 dentro de 8 horas.

[0052] Modalidade 43. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-39, em que a administração resulta na produção de mais do que cerca de 1 pg/mg de tecido do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 durante até 6 dias.

[0053] Modalidade 44. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-39, em que a nanopartícula ou a composição farmacêutica é administrada por via intradérmica.

[0054] Modalidade 45. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-39, em que a concentração do RNA modificado é de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg.

[0055] Modalidade 46. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-39, em que a administração resulta em um aumento da produção do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 por um

fator de cerca de 5 a cerca de 100, quando comparado com uma administração do RNA modificado em um tampão salino de citrato.

[0056] Modalidade 47. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-39, em que o sujeito sofre de diabetes.

[0057] Modalidade 48. O método de acordo com qualquer uma das modalidades 28-39, em que a ferida é uma ferida cirúrgica, uma queimadura, uma ferida abrasiva, um local de biópsia da pele, uma ferida crônica, uma lesão (por exemplo, uma ferida de lesão traumática), uma ferida de enxerto, uma ferida diabética, uma úlcera diabética (por exemplo, úlcera de pé diabético), uma úlcera por pressão, escaras e suas combinações.

[0058] Modalidade 49. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 28-39, em que a composição farmacêutica compreende um excipiente farmacologicamente aceitável, preferencialmente um solvente, meios de dispersão, diluente, agente de dispersão, auxiliar de suspensão, tensoativo, agente isotônico, agente espessante ou emulsificante, conservante, polímero, peptídeo, proteína, célula, hialuronidase e suas misturas.

[0059] Modalidade 50. Um método para induzir neovascularização em um tecido de mamífero ou em um sujeito compreendendo administrar ao tecido de mamífero ou sujeito uma quantidade eficaz da nanopartícula de acordo com qualquer uma das modalidades 1-11 ou a composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das modalidades 12-27.

[0060] Modalidade 51. Um método para induzir angiogênese em um tecido de mamífero ou em um sujeito compreendendo administrar ao tecido de mamífero ou sujeito uma quantidade eficaz da nanopartícula de acordo com qualquer uma das modalidades 1-11 ou a composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das modalidades 12-27.

[0061] Modalidade 52. Um método para aumentar a densidade

capilar e/ou arteríola em um tecido de mamífero ou em um sujeito compreendendo administrar ao tecido de mamífero ou sujeito uma quantidade eficaz da nanopartícula de acordo com qualquer uma das modalidades 1-11 ou a composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das modalidades 12-27.

6. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0062] Os peritos na técnica compreenderão que as figuras, descritas abaixo, são apenas para fins ilustrativos. As figuras não se destinam de forma alguma a limitar o escopo dos presentes ensinamentos.

[0063] FIG. 1: FIG. 1 mostra o composto lipídico (composto A) usado nos exemplos.

[0064] FIG. 2A e 2B: Um diagrama da estrutura (FIG. 2A) de um construto de RNA VEGF-A modificado e a sequência (SEQ ID NO: 1, FIG. 2B) de um RNA modificado representativo de VEGF-A.

[0065] FIG. 3: Teor de proteína VEGF-A humana em biópsias de pele como uma função do tempo até 144 horas nosso após injeção intradérmica de 100 µg de RNA modificado de VEGF-A formulada em solução salina de citrato de (triângulos, linha a tracejado) e 3 µg de RNA modificado de VEGF-A formulado em nanopartículas lipídicas (LNP) (círculos, linha sólida), respectivamente. As linhas representam a mediana em cada ponto de tempo.

[0066] FIG. 4: Teor de proteína VEGF-A humana em biópsias de pele como uma função do tempo até 48 horas nosso após injeção intradérmica de 100 µg de RNA modificado de VEGF-A formulada em solução salina de citrato de (triângulos, linha a tracejado) e 3 µg de RNA modificado de VEGF-A formulado em LNP (círculos, linha sólida), respectivamente. As linhas representam a mediana em cada ponto de tempo.

[0067] FIG. 5: Percentagem de cicatrização de feridas após injeção

intradérmica das seguintes composições: (1) uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 1 µg de RNA modificado de VEGF-A (n=6), (2) uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 µg de RNA modificado de VEGF-A (n=6), (3) uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 µg de RNA não traduzível de VEGF-A (n=6) e (4) uma composição salina de citrato compreendendo 100 µg de RNA modificado de VEGF-A (n=7).

[0068] FIG. 6: Percentagem de cicatrização de feridas após injeção intradérmica das seguintes composições: (1) uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 µg de RNA modificado de VEGF-A (n=5), (2) uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 µg de RNA modificado não traduzível de VEGF-A (n=5) e (3) uma composição salina de citrato que não compreende qualquer RNA modificado (n=5).

[0069] FIG. 7: Percentagem de cicatrização de feridas após injeção intradérmica das seguintes composições: (1) uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 µg de RNA modificado de VEGF-A (n=6), (2) uma composição de nanopartículas lipídicas que não compreende nenhum RNA modificado (n=5), (3) uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 µg de RNA modificado de GFP (n=6) e (4) uma composição salina de citrato que não compreende nenhum RNA modificado (n=6).

[0070] FIG. 8: Percentagem de cicatrização de feridas após injeção intradérmica das seguintes composições: (1) uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 µg de RNA modificado de VEGF-A não traduzível (n=7), (2) uma composição salina de citrato compreendendo 100 µg de RNA modificado de VEGF-A (n=7), (3) uma composição salina de citrato compreendendo 100 µg de RNA modificado de VEGF-A não traduzível (n=7) e (4) uma composição salina de citrato que não compreende nenhum RNA modificado (n=7).

7. DESCRIÇÃO DETALHADA

[0071] Todas as referências referidas nesta descrição são no presente documento incorporadas como referência na sua totalidade.

[0072] Muitas modificações e outras modalidades das divulgações no presente documento estabelecidas acorrerão à ideia de um perito na técnica à qual estas divulgações pertencem, tirando proveito dos ensinamentos apresentados nas descrições acima expostas e desenhos associados. Por conseguinte, deve se entender que as divulgações não são para se limitar às modalidades específicas descritas, e que se pretende incluir modificações e outras modalidades no escopo das reivindicações anexas. Embora no presente documento sejam aplicados termos específicos, eles são usados num sentido genérico e descritivo apenas, e não com finalidade limitativa.

[0073] As unidades, prefixos e símbolos podem ser indicados na sua forma aceite no SI. Salvo indicação em contrário, os ácidos nucleicos são escritos da esquerda para a direita, na orientação 5' para 3'; as seqüências de aminoácidos são escritas da esquerda para a direita, na orientação amino para carbóxi, respectivamente. Intervalos numéricos incluem os números que definem a gama. A enumeração de gamas de valores no presente documento pretende meramente servir como um método abreviado de fazer referência individualmente a cada valor separado que cai dentro da gama. Salvo indicação em contrário no presente documento, cada valor individual é incorporado no relatório descritivo como se ele no presente documento fosse individualmente enumerado. Os aminoácidos podem ser referidos no presente documento pelos seus símbolos de três letras comumente conhecidos ou pelos símbolos de uma letra recomendados pela IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.. Os nucleotídeos, do mesmo modo, podem ser referidos pelos seus códigos de uma letra comumente aceites.

7.1. Definições

[0074] Salvo definição específica em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado que o comumente entendido por um perito na técnica à qual esta descrição pertence. Salvo menção em contrário, as técnicas no presente documento usadas ou contempladas são metodologias-padrão bem conhecidas de um perito na técnica. A prática da presente descrição usará, salvo indicação em contrário, técnicas convencionais de microbiologia, cultura de tecidos, biologia molecular, química, bioquímica e tecnologia de DNA recombinante, que se encontram dentro da capacidade da técnica. Os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não limitativos. O que se segue é apresentado a título ilustrativo e não pretende limitar o escopo da descrição.

[0075] Em algumas modalidades, os parâmetros numéricos estabelecidos no relatório descritivo (no qual as reivindicações são incorporadas na sua integralidade) são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas que se procura obter por uma modalidade particular. Em algumas modalidades, os parâmetros numéricos devem ser interpretados à luz do número de dígitos significativos relatados e aplicando técnicas de arredondamento comuns. Não obstante os intervalos numéricos e os parâmetros que estabelecem o amplo escopo de algumas modalidades da presente descrição serem aproximações, os valores numéricos estabelecidos nos exemplos específicos são relatados tão precisamente quanto o praticável. Os valores numéricos apresentados em algumas modalidades da presente descrição podem conter certos erros que resultam necessariamente do desvio-padrão encontrado nas suas respectivas medições de teste. A enumeração de gamas de valores no presente documento pretende meramente servir como um método abreviado de fazer referência individualmente a cada valor separado que cai dentro da gama. Salvo indicação em contrário no pre-

sente documento, cada valor individual é incorporado no relatório descritivo como se ele no presente documento fosse individualmente enumerado.

[0076] Por uma questão de conveniência, certos termos usados em todo o pedido (incluindo o relatório descritivo, exemplos, e reivindicações anexas) são no presente documento compilados. A não ser que definidos de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado como comumente entendido por um perito na técnica à qual esta descrição pertence.

[0077] Em algumas modalidades, números que expressam quantidades de ingredientes, propriedades tais como peso molecular, condições de reação e resultados e assim por diante, usados para descrever e reivindicar certas modalidades da presente descrição, devem ser entendidos como sendo modificados em alguns casos pelo termo "cerca de". Alguém versado na técnica entenderia o significado do termo "cerca de" no contexto do valor que ele qualifica. Em algumas modalidades, o termo "cerca de" é usado para indicar que um valor inclui o desvio padrão da média para o dispositivo ou método que está sendo aplicado para determinar o valor. Em algumas modalidades, os parâmetros numéricos estabelecidos no relatório descritivo (no qual as reivindicações são incorporadas na sua integralidade) são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas que se procura obter por uma modalidade particular. Em algumas modalidades, os parâmetros numéricos devem ser interpretados à luz do número de dígitos significativos relatados e aplicando técnicas de arredondamento comuns. Não obstante os intervalos numéricos e os parâmetros que estabelecem o amplo escopo de algumas modalidades da presente descrição serem aproximações, os valores numéricos estabelecidos nos exemplos específicos são relatados tão precisamente quanto o praticável. Os valores

numéricos apresentados em algumas modalidades da presente descrição podem conter certos erros que resultam necessariamente do desvio-padrão encontrado nas suas respectivas medições de teste.

[0078] Como usado no presente documento, o termo "administração" refere-se à colocação de uma nanopartícula e/ou uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos uma nanopartícula em um tecido de mamífero ou em um sujeito por um método ou via que resulta em pelo menos uma localização parcial da nanopartícula e/ou composição em um sítio ou localização de tecido desejado. Em algumas modalidades, as nanopartículas compreendendo um componente lipídico e um RNA modificado podem ser administradas por uma via intradérmica. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da proteína expressa pelo RNA modificado está localizada em uma localização de tecido alvo ou célula alvo desejado via administração intradérmica.

[0079] O termo "composição farmacêutica" refere-se a uma mistura que contém um componente terapeuticamente ativo e um transportador ou excipiente, tal como um transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitável que é convencional na técnica. Por exemplo, uma composição farmacêutica como no presente documento usada geralmente compreende pelo menos um componente lipídico, um RNA modificado de acordo com a descrição e um excipiente adequado.

[0080] O termo "composto" inclui todos os isótopos e isômeros da estrutura representada. "Isótopo" refere-se aos átomos que têm o mesmo número atômico, porém, números de massa diferentes que resultam de um número diferente de nêutrons nos núcleos. Por exemplo, os isótopos de hidrogênio incluem o trítio e o deutério. Adicionalmente, um composto, sal ou complexo da presente revelação pode ser preparado em combinação com moléculas de solvente ou água para formar solvatos e hidratos através de métodos de rotina. "Isômero" significa qualquer isômero geométrico, tautômero, zwitterion, estereoisômero,

enantiômero ou diastereoisômero de um composto. Os compostos podem incluir um ou mais centros quirais e/ou ligações duplas e, portanto, podem existir como estereoisômeros, tais como isômeros de ligação dupla ou diastereoisômeros. A presente descrição abrange todo e qualquer isômero dos compostos no presente documento descritos, incluindo formas estereoisomericamente puras e misturas enantioméricas e estereoisoméricas, por exemplo, racematos. Misturas enantioméricas e estereoisoméricas de compostos e meios para resolvê-las nos seus componentes de enantiômeros ou estereoisômeros são bem conhecidas na técnica.

[0081] Os termos "compreendem", "têm" e "incluem" são verbos de ligação abertos. Quaisquer formas ou tempos de um ou mais destes verbos, tais como "compreende", "compreendendo", "tem", "tendo", "inclui" e "incluindo", também são abertos. Por exemplo, qualquer método que "compreenda", "tenha" ou "inclua" uma ou mais etapas, não se limita a possuir apenas aquela uma ou mais etapas e pode também cobrir outras etapas não listadas. De forma similar, qualquer composição que "compreenda", "tenha" ou "inclua" uma ou mais características, não se limita a possuir apenas aquela uma ou mais características e pode cobrir outras características não listadas. O uso de qualquer e todos os exemplos, ou linguagem exemplificativa (por exemplo "tal como"), fornecidos relativamente a certas modalidades no presente documento pretende meramente esclarecer melhor a presente descrição e não coloca uma limitação no escopo da presente descrição de outra forma reivindicada. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial para a prática da presente descrição.

[0082] O termo "consistindo essencialmente em" permite a presença de materiais ou etapas adicionais que "não afetam materialmente a(s) característica(s) básica(s) e nova(s) da invenção.

[0083] O termo "consistindo em" refere-se a composições, métodos, e respectivos componentes dos mesmos tais como no presente documento descritos, que são exclusivos de qualquer elemento não enumerado nessa descrição da modalidade.

[0084] O termo "entregar" significa fornecer uma entidade a um destino. Por exemplo, entregar uma terapêutica a um sujeito pode envolver a administração de uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos uma nanopartícula incluindo o RNA modificado ao sujeito (por exemplo, por uma via intradérmica). A administração de uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos uma nanopartícula ao tecido de mamífero ou um sujeito pode envolver o contato de uma ou mais células com a composição farmacêutica.

[0085] Os termos "doença" ou "distúrbio" são no presente documento usados indistintamente, e referem-se a qualquer alteração no estado do corpo ou de alguns dos órgãos, interrompendo ou perturbando o desempenho das funções e/ou provocando sintomas tais como desconforto, disfunção, angústia, ou mesmo morte à pessoa atingida ou aos que estão em contato com uma pessoa. Uma doença ou distúrbio também se pode referir a uma enfermidade, doente, incômodo, padecimento, moléstia, mal, queixa, indisposição, ou fraqueza.

[0086] O termo "quantidade eficaz", tal como no presente documento usado, refere-se à quantidade de agente terapêutico (por exemplo, um RNA modificado), composição farmacêutica suficiente para reduzir pelo menos um ou mais sintoma(s) da doença ou distúrbio, ou para fornecer o efeito desejado. Por exemplo, pode ser a quantidade que induz uma redução terapêuticamente significativa em um sintoma ou marcador clínico associado à cicatrização de feridas.

[0087] Como usado no presente documento, "expressão" de uma sequência de ácidos nucleicos refere-se a um ou mais dentre os seguin-

tes eventos: (1) produção de um modelo de RNA a partir de uma sequência de DNA (por exemplo, por transcrição); (2) processamento de um transcrito de RNA (por exemplo, por *splicing*, edição, formação de extremidade 5' e/ou processamento de extremidade 3'); (3) tradução de um RNA em um polipeptídeo ou proteína; e (4) modificação pós-tradução de um polipeptídeo ou proteína.

[0088] Como no presente documento usado, o termo "componente lipídico" é o componente de uma nanopartícula que inclui um ou mais lipídeos. Por exemplo, o componente lipídico pode incluir um ou mais lipídeos catiônicos/ionizáveis, PEGuilados, estruturais ou outros, tais como fosfolipídeos. Em uma modalidade, o componente lipídico compreende o composto A (FIG. 1).

[0089] Tal como no presente documento usado, o termo "RNA modificado" refere-se a moléculas de RNA contendo uma, duas, ou mais de duas modificações nucleosídicas em comparação com a adenosina (A) ((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-il)-5-(hidroximetil)oxolano-3,4-diol), guanosina (G) (2-Amino-9-[3,4-di-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-3*H*-purin-6-ona), citidina (C) (4-amino-1-[3,4-di-hidroxi-5-(hidroximetil)tetra-hidrofuran-2-il]pirimidin-2-ona), e uridina (U) (1-[(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-di-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]pirimidino-2,4-diona), ou em comparação com a AMP, GMP, CMP, e UMP, em moléculas de RNA, ou uma sua porção. Exemplos não limitativos de modificações nucleosídicas são fornecidos em outro sítio neste relatório descritivo. Quando a sequência nucleotídica de um RNA particular reivindicado é de outra forma idêntica à sequência de uma molécula e RNA que existe naturalmente, o RNA modificado é compreendido como sendo uma molécula de RNA com pelo menos uma modificação diferente das existentes no homólogo natural. A diferença pode ser na mudança química no nucleosídeo/nucleotídeo ou na posição dessa mudança na sequência. Em uma modalidade, o RNA modificado é RNA mensageiro

modificado (ou "mRNA modificado"). Em algumas modalidades, um RNA modificado inclui pelo menos um UMP que é modificado para formar N1-metil-pseudo-UMP. Em algumas modalidades, todos os UMP em um RNA modificado foram substituídos por N1-metil-pseudo-UMP.

[0090] Como usado no presente documento, uma "nanopartícula" é uma partícula compreendendo um ou mais lipídeos e um ou mais agentes terapêuticos. As nanopartículas são tipicamente dimensionadas na ordem de micrômetros ou menores e podem incluir uma bicamada lipídica. Em algumas modalidades, a nanopartícula tem um diâmetro médio (por exemplo, um diâmetro hidrodinâmico) de entre cerca de 50 nm e cerca de 100 nm, por exemplo entre cerca de 60 nm e cerca de 90 nm, entre 70 nm e 80 nm de diâmetro, como medido por dispersão dinâmica de luz (ver Publicação Especial NIST 1200-6, "Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch Mode Dynamic Light Scattering"). Em algumas modalidades, a nanopartícula tem um diâmetro hidrodinâmico médio de cerca de 71 nm, 72 nm, 73 nm, 74 nm, 75 nm, 76 nm, 77 nm, 78 nm, 79 nm, 80 nm, 81 nm, 82 nm, 83 nm, 84 nm, 85 nm, 86 nm, 87 nm, 88 nm, 89 nm ou 90 nm. Em algumas modalidades, o agente terapêutico é um RNA modificado. Em algumas modalidades, as nanopartículas compreendem o Composto A, como mostrado na FIG. 1 e um RNA modificado.

[0091] Tal como no presente documento usado, o "índice de polidispersão (pDI)" é a medida da distribuição de tamanhos nanopartículas em uma amostra nanoparticulada (ver Publicação Especial NIST 1200-6, "Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch Mode Dynamic Light Scattering"). Em algumas modalidades, o índice de polidispersividade está entre cerca de 0,10 e cerca de 0,20, por exemplo, cerca de 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19 ou 0,20.

[0092] Como no presente documento usado, a "razão N:P" é a razão molar de átomos de nitrogênio ionizáveis (na gama de pH fisiológico) em um lipídeo para grupos de fosfato em um RNA, por exemplo, em uma nanopartícula incluindo um componente lipídico e um RNA modificado.

[0093] Tal como no presente documento usado, o termo "ácido nucleico", no seu sentido mais lato, inclui qualquer composto e/ou substância que compreende um polímero de nucleotídeos ligados através de uma ligação fosfodiéster. Estes polímeros são frequentemente referidos como oligonucleotídeos ou polinucleotídeos, dependendo do tamanho. Os termos "sequência polinucleotídica" e "sequência nucleotídica" também no presente documento são usados indistintamente.

[0094] Como no presente documento usado, um "lipídeo PEG" ou "lipídeo PEGuilado" refere-se a um lipídeo compreendendo um componente de polietilenoglicol.

[0095] A frase "farmaceuticamente aceitável" é usada no presente documento para fazer referência àqueles compostos, materiais, composições e/ou formas de dosagem que são, dentro do escopo do bom senso médico, adequados para uso em contato com tecidos de seres humanos e animais, sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, e compatíveis com uma razão razoável benefício/risco. As agências de aprovação de fármacos (por exemplo, EMA, US-FDA) fornecem orientação e aprovam compostos, materiais, composições e/ou formas de dosagem farmaceuticamente aceitáveis. Podem são listados exemplos nas Farmacopeias.

[0096] A frase "excipiente farmaceuticamente aceitável" é no presente documento usada para fazer referência a um material farmaceuticamente aceitável, escolhido de um solvente, meios de dispersão, diluente, agente de dispersão, auxiliar de suspensão, tensoativo, agente isotônico, agente espessante ou emulsionante, conservante, polímero,

peptídeo, proteína, célula, hialuronidase e suas misturas. Em algumas modalidades, o solvente é um solvente aquoso.

[0097] Como no presente documento usado, um "fosfolipídeo" é um lipídeo que inclui uma fração fosfato e uma ou mais cadeias de carbono, tal como cadeias de ácidos graxos insaturados. Um fosfolipídeo pode incluir uma ou mais ligações (por exemplo, uma ou mais insaturações) múltiplas (por exemplo, duplas ou triplas). Fosfolipídeos específicos podem facilitar a fusão com uma membrana. Por exemplo, um fosfolipídeo catiônico pode interagir com um ou mais fosfolipídeos negativamente carregados de uma membrana (por exemplo, uma membrana celular ou intracelular). A fusão de um fosfolipídeo a uma membrana pode permitir que um ou mais elementos de uma composição contendo lipídeos passem através da membrana, permitindo, por exemplo, a entrega de um ou mais elementos a uma célula.

[0098] Tal como no presente documento usado, "polipeptídeo" designa um polímero de resíduos de aminoácidos (naturais ou não naturais) ligados entre si mais frequentemente por ligações peptídicas. O termo, como usado no presente documento, refere-se a proteínas, polipeptídeos e peptídeos de qualquer tamanho, estrutura ou função. Um polipeptídeo pode ser uma única molécula ou pode ser um complexo multimolecular tal como um dímero, trímero ou tetrâmero. Eles também podem compreender polipeptídeos de cadeia única ou multicadeia tais como anticorpos ou insulina, e podem estar associados ou ligados. As ligações de dissulfeto mais comumente conhecidas são constatadas em polipeptídeos de múltiplas cadeias. O termo polipeptídeo também se pode aplicar a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são um análogo químico artificial de um aminoácido correspondente que ocorre naturalmente.

[0099] Tal como no presente documento usada, "proteína" é um polímero consistindo essencialmente em qualquer dos 20 aminoácidos.

Embora "polipeptídeo" seja frequentemente usado em referência a polipeptídeos relativamente grandes, e "peptídeo" seja frequentemente usado em referência a polipeptídeos pequenos, a utilização destes termos na técnica se sobrepõe e é variada. Os termos "peptídeo(s)", "proteína(s)" e "polipeptídeo(s)" são por vezes no presente documento usados indistintamente.

[0100] O termo "sujeito" refere-se a um animal, por exemplo a um humano, a quem é fornecido tratamento, incluindo tratamento profilático, com métodos e composições no presente documento descritos. Para o tratamento daquelas condições ou estados patológicos que são específicos de um animal específico tal como um sujeito humano, o termo "sujeito" refere-se a esse animal específico.

[0101] O termo "tecido" refere-se a um grupo ou camada de células especializadas de forma similar, que conjuntamente efetuam certas funções especiais.

[0102] Como usado no presente documento, os termos "tratar", "tratamento", ou "tratando" referem-se a uma melhoria ou eliminação de uma doença ou distúrbio ou, pelo menos, um sintoma perceptível dos mesmos. Em algumas modalidades, "tratamento" ou "tratando" refere-se a uma melhoria ou eliminação de pelo menos um parâmetro físico mensurável, não necessariamente discernível pelo paciente.

[0103] Deve ser entendido que esta descrição não se limita à metodologia particular, protocolos, e reagentes, etc., no presente documento descritos, e que como tal pode variar. A terminologia no presente documento usada tem o objetivo de descrever apenas modalidades particulares, e não pretende limitar o escopo da presente descrição, que é definida apenas pelas reivindicações.

7.2. Componentes lipídicos

[0104] Nanopartículas compreendem um componente lipídico incluindo Composto A (FIG. 1). Compostos adicionais são descritos em WO

2017/049245 A2 (ver, por exemplo, compostos 1-147 em WO 2017/049245 A2), que é incorporado no presente documento por referência na sua totalidade. Os componentes lipídicos também podem incluir uma variedade de outros lipídeos, tal como um fosfolipídeo, um lipídeo estrutural e/ou um lipídeo PEG.

Fosfolipídeos

[0105] O componente lipídico de uma nanopartícula pode incluir um ou mais fosfolipídeos, tal como um ou mais lipídeos (poli)insaturados. Os fosfolipídeos podem se agrupar em uma ou mais bicamadas lipídicas. Em geral, os fosfolipídeos podem incluir uma fração de fosfolipídeo e uma ou mais frações de ácido graxo.

[0106] Os fosfolipídeos úteis nas composições e métodos podem ser selecionados do grupo não limitativo consistindo em 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dilinoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diundecanoil-sn-glicero-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0 Diéter PC), 1-oleoil-2-colesteril-hemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemPC), 1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 Liso PC), 1,2-dilinolenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16,0 PE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinolenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sódio (DOPG) e esfingomielina. Em algumas modalidades, um componente lipídico inclui DSPC. Em algumas modalidades, um componente

lipídico inclui DOPE. Em algumas modalidades, um componente lipídico inclui DSPC e DOPE.

Lipídeos Estruturais

[0107] O componente lipídico de uma nanopartícula pode incluir um ou mais lipídeos estruturais. Os lipídeos estruturais podem ser selecionados, mas não estão limitados a, colesterol, fecosterol, sitosterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, tomatidina, tomatina, ácido ursólico, alfa-tocoferol e suas misturas. Em algumas modalidades, o lipídeo estrutural é colesterol. Em algumas modalidades, o lipídeo estrutural inclui colesterol e um corticosteroide (tal como prednisona, dexametasona, prednisona e hidrocortisona) ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, um componente lipídico inclui colesterol.

Lipídeos PEG

[0108] O componente lipídico de uma nanopartícula pode incluir um ou mais lipídeos PEG ou PEG modificados. Tais lipídeos podem ser alternativamente denominados de lipídeos PEGuilados. Um lipídeo PEG é um lipídeo modificado com polietilenoglicol. Um lipídeo PEG pode ser selecionado de entre o grupo não limitativo consistindo em fosfatidiletanolaminas modificadas com PEG, ácidos fosfatídicos modificados com PEG, ceramidas modificadas com PEG, dialquilaminas modificadas com PEG, diacilglicerós modificados com PEG, dialquilgliceróis modificados com PEG e misturas dos mesmos. Por exemplo, um lipídeo PEG pode ser PEG-c-DOMG, PEG-DMG (1,2-dimiristoil-OT-glicerol metóxi-pol etilenoglicol, obtido de Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC, ou um lipídeo PEG-DSPE. Em algumas modalidades, um componente lipídico inclui PEG-DMG.

7.3. RNA Modificados Codificando Polipeptídeos VEGF-A

[0109] É de grande interesse nas áreas da terapia, diagnóstico, reagentes e ensaios biológicos, ser possível entregar um ácido nucleico,

por exemplo, um ácido ribonucleico (RNA) no interior de uma célula, quer *in vitro*, *in vivo*, *in situ*, ou *ex vivo*, de modo a provocar a tradução intracelular do ácido nucleico e a produção de um polipeptídeo codificado de interesse.

[0110] Os RNA que ocorrem naturalmente são sintetizados a partir de quatro ribonucleotídeos básicos: ATP, CTP, UTP e GTP, mas podem conter nucleotídeos modificados pós-transcricionalmente. Para além disso, foram identificadas aproximadamente cem modificações nucleosídicas diferentes no RNA (Rozenski, J, Crain, P, e McCloskey, J., The RNA Modification Database: 1999 update, Nucl Acids Res, (1999) 27: 196-197).

[0111] De acordo com a presente descrição, estes RNA são preferencialmente modificados de modo a evitar as deficiências de outras moléculas de RNA da técnica (por exemplo, ativando a resposta imune inata e a rápida degradação após administração). Assim, estes polinucleotídeos são referidos como RNA modificado. Em algumas modalidades, o RNA modificado evita a resposta imune inata após administração a um sujeito. Em algumas modalidades, a meia-vida do RNA modificado é prolongada em comparação com um RNA não modificado.

[0112] Em modalidades preferidas, a molécula de RNA é um RNA mensageiro (mRNA). Tal como no presente documento usado, o termo "RNA mensageiro" (mRNA) refere-se a qualquer polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de interesse, e que é capaz de ser traduzido para produzir o polipeptídeo codificado de interesse *in vitro*, *in vivo*, *in situ* ou *ex vivo*.

[0113] Tal como representado na FIG. 2A, tradicionalmente, os componentes básicos de uma molécula de mRNA incluem pelo menos uma região codificadora, uma região não traduzida (UTR) 5', uma região não traduzida (UTR) 3', uma extremidade 5' e uma cauda poli-(A). Com base nesta estrutura modular do tipo selvagem, a presente descrição

expande o escopo de funcionalidades das moléculas de mRNA tradicionais ao fornecer polinucleotídeos ou construtos de RNA primários que mantêm uma organização modular, mas que compreendem uma ou mais modificações ou alterações estruturais e/ou químicas que conferem propriedades úteis ao polinucleotídeo incluindo, em algumas modalidades, a falta de uma indução substancial da resposta imune inata de uma célula na qual o polinucleotídeo é introduzido.

[0114] Os RNA modificados podem incluir qualquer modificação útil relativa à cadeia nucleotídica de RNA padrão, tal como ao açúcar, à nucleobase (por exemplo, uma ou mais modificações de uma nucleobase, tal como trocando ou substituindo um átomo de uma nucleobase pirimidina por um amino opcionalmente substituído, tiol opcionalmente substituído, alquila opcionalmente substituída (por exemplo, metila ou etila), ou halogênio (por exemplo, cloro ou flúor)), ou à ligação internucleosídica (por exemplo, uma ou mais modificações ao esqueleto de fosfodiéster).

[0115] Como exemplos não limitativos, em algumas modalidades, um RNA modificado pode incluir, por exemplo, pelo menos uma uridina monofosfato (UMP) que é modificada para formar N1-metil-pseudo-UMP. Em algumas modalidades, o N1-metil-pseudo-UMP está presente em vez de UMP em uma porcentagem dos UMP na sequência de 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99,9%, e 100%. Em algumas modalidades, todos os UMP foram substituídos por N1-metil-pseudo-UMP.

[0116] Em algumas modalidades, os RNA modificados compreendem uma modificação na extremidade 5', tal como uma extremidade 5' diguanosina. Em algumas modalidades, os RNA modificados compreendem uma modificação em uma região codificadora. Em algumas modalidades, os RNA modificados compreendem uma modificação em

uma UTR 5'. Em algumas modalidades, os RNA modificados compreendem uma modificação em uma UTR 3'. Em algumas modalidades, os RNA modificados compreendem uma modificação em uma cauda poli-(A). Em algumas modalidades, os RNA modificados compreendem qualquer combinação de modificações a uma região codificadora, extremidade 5', UTR 5', UTR 3', ou cauda poli-(A). Em algumas modalidades, um RNA modificado pode opcionalmente ser tratado com uma fosfatase alcalina.

[0117] Em algumas modalidades, um RNA modificado codifica um polipeptídeo Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), qualquer um de uma grande família de proteínas VEGF que desempenham uma função central na regulação da cicatrização de feridas em geral. As funções do VEGF também incluem a ativação da sinalização do óxido nítrico (NO), desenvolvimento e angiogênese pós-natal, angiogênese tumoral, arteriogênese, replicação endotelial, e interruptor do destino celular para progenitores cardiovasculares multipotentes.

[0118] Será reconhecido pelos peritos na técnica que para qualquer gene VEGF particular pode existir uma ou mais variantes ou isoformas. Exemplos não limitativos de polipeptídeos VEGF-A de acordo com a presente descrição estão listados na Tabela 1. Será reconhecido pelos peritos na técnica que as sequências descritas na Tabela 1 contêm potenciais regiões flanqueadoras. Estas estão codificadas em cada sequência nucleotídica para 5' (a montante) ou 3' (a jusante) do quadro de leitura aberta. O quadro de leitura aberta é definitiva e especificamente descrito ensinando a sequência nucleotídica de referência. Também é possível caracterizar adicionalmente as regiões flanqueadoras 5' e 3' usando uma ou mais bases de dados ou algoritmos disponíveis. As bases de dados têm anotadas as características contidas nas regiões flanqueadoras das sequências NCBI, e estas estão disponíveis na técnica.

Tabela 1: Isoformas de mRNA do VEGF-A de *Homo sapiens*.

| Descrição | Ref. NM | Ref. NP |
|--|----------------|----------------|
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 1 do transcrito, mRNA | NM_001171623,1 | NP_001165094,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 1 do transcrito, mRNA | NM_001025366,2 | NP_001020537,2 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 2 do transcrito, mRNA | NM_001171624,1 | NP_001165095,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 2 do transcrito, mRNA | NM_003376,5 | NP_003367,4 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 3 do transcrito, mRNA | NM_001171625,1 | NP_001165096,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 3 do transcrito, mRNA | NM_001025367,2 | NP_001020538,2 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 4 do transcrito, mRNA | NM_001171626,1 | NP_001165097,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 4 do transcrito, mRNA | NM_001025368,2 | NP_001020539,2 |
| <i>Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de Homo sapiens, variante 4 do transcrito, mRNA</i> | NM_001317010,1 | NP_001303939,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 5 do transcrito, mRNA | NM_001171627,1 | NP_001165098,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 5 do transcrito, mRNA | NM_001025369,2 | NP_001020540,2 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 6 do transcrito, mRNA | NM_001171628,1 | NP_001165099,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 6 do transcrito, mRNA | NM_001025370,2 | NP_001020541,2 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 7 do transcrito, mRNA | NM_001171629,1 | NP_001165100,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 7 do transcrito, mRNA | NM_001033756,2 | NP_001028928,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 8 do transcrito, mRNA | NM_001171630,1 | NP_001165101,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 8 do transcrito, mRNA | NM_001171622,1 | NP_001165093,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 9 do transcrito, mRNA | NM_001204385,1 | NP_001191314,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 9 do transcrito, mRNA | NM_001204384,1 | NP_001191313,1 |
| Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) de <i>Homo sapiens</i> , variante 10 do transcrito, mRNA | NM_001287044,1 | NP_001273973,1 |

[0119] Será reconhecido pelos peritos na técnica que as moléculas de RNA codificando polipeptídeos VEGF-A, por exemplo, um polipeptí-

deo VEGF-A humano, podem ser concebidas de acordo com as isoformas de mRNA de VEGF-A listadas na Tabela 1. Um comum perito na técnica está geralmente familiarizado com as múltiplas isoformas dos restantes membros da família VEGF.

[0120] Em uma modalidade, a presente descrição fornece um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A (por exemplo, SEQ ID NO: 2). Em algumas modalidades, um RNA modificado codifica um polipeptídeo VEGF-A, em que o RNA modificado compreende qualquer uma de SEQ ID NOs: 1 e 3-5. Em algumas modalidades, o RNA modificado compreende ainda uma extremidade 5', uma UTR 5', uma UTR 3', uma cauda poli(A), ou qualquer suas combinações. Em algumas modalidades, a extremidade 5', a UTR 5', a UTR 3', a cauda poli(A), ou qualquer suas combinações pode incluir um ou mais nucleotídeos modificados.

[0121] Em algumas modalidades, um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A pode ter a estrutura tal como apresentada na FIG. 2B, que é a SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A pode ter a sequência de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3-5.

7.4. Composições Compreendendo Componente Lipídico e RNA Modificado

[0122] Algumas modalidades referem-se a nanopartículas que incluem um componente lipídico e um RNA modificado.

[0123] Em algumas modalidades, o componente lipídico de uma nanopartícula pode incluir o Composto A (FIG. 1). Em algumas modalidades, o componente lipídico de uma nanopartícula pode ainda incluir um fosfolípido, um lipídeo estrutural e/ou um lipídeo PEG, como no presente documento descrito. Por exemplo, em algumas modalidades, o componente lipídico de uma nanopartícula pode incluir DSPC, colesterol, PEG-DMG e suas misturas.

[0124] Os elementos do componente lipídico podem ser fornecidos em frações específicas. Em algumas modalidades, o componente lipídico de uma nanopartícula inclui o Composto A, um fosfolípídeo, um lipídeo estrutural e um lipídeo PEG. Em algumas modalidades, o componente lipídico da nanopartícula inclui de cerca de 30% molar a cerca de 60% molar de Composto A, de cerca de 0% molar a cerca de 30% molar de fosfolípídeo, de cerca de 18,5% molar a cerca de 48,5% molar de lipídeo estrutural, e de cerca de 0% molar a cerca de 10% molar de lipídeo PEG, desde que a % molar total não exceda 100%. Em algumas modalidades, o componente lipídico da nanopartícula inclui de cerca de 35% molar a cerca de 55% molar de Composto A, de cerca de 5% molar a cerca de 25% molar de fosfolípídeo, de cerca de 30% molar a cerca de 40% molar de lipídeo estrutural, e de cerca de 0% molar a cerca de 10% molar de lipídeo PEG. Em algumas modalidades, o componente lipídico inclui cerca de 50% molar de Composto A, cerca de 10% molar de fosfolípídeo, cerca de 38,5% molar em lipídeos estruturais e cerca de 1,5% molar de lipídeo PEG. Em algumas modalidades, o fosfolípídeo pode ser DOPE. Em algumas modalidades, o lipídeo estrutural pode ser colesterol. Em algumas modalidades, o lipídeo PEG pode ser PEG-DMG.

[0125] Em algumas modalidades, o componente de RNA modificado de uma nanopartícula pode incluir um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A, como no presente documento descrito (por exemplo, SEQ ID NO: 2). Em algumas modalidades, o componente de RNA modificado de uma nanopartícula pode incluir o RNA modificado compreende qualquer uma de SEQ ID NOs: 1 e 3-5. Em algumas modalidades, o RNA modificado compreende ainda uma extremidade 5', uma UTR 5', uma UTR 3', uma cauda poli(A), ou qualquer suas combinações. Em algumas modalidades, a extremidade 5', a UTR 5', a UTR 3', a cauda poli(A), ou qualquer suas combinações pode incluir um ou

mais nucleotídeos modificados.

[0126] Em algumas modalidades, as quantidades relativas do componente lipídico e o RNA modificado em uma nanopartícula pode variar. Em algumas modalidades, a razão em p/p do componente lipídico para o RNA modificado em uma nanopartícula pode ser de cerca de 5:1 a cerca de 100:1, tal como 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, e 100:1. Por exemplo, a razão em p/p do componente lipídico para o RNA modificado pode ser de cerca de 10:1 a cerca de 40:1. Em algumas modalidades, a razão em p/p é de cerca de 20:1. Em algumas modalidades, a razão em p/p é de cerca de 10:1.

[0127] Em algumas modalidades, as quantidades relativas do componente lipídico e o RNA modificado em uma nanopartícula podem ser fornecidas por uma razão N:P específica. A razão N:P da composição refere-se à razão molar de átomos de nitrogênio em um ou mais lipídeos e ao número de grupos fosfato em um RNA. Em geral, uma razão de N:P menor é preferencial. Em algumas modalidades, a razão N:P pode ser de cerca de 2:1 a cerca de 30:1, tal como 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 12:1, 14:1, 16:1, 18:1, 20:1, 22:1, 24:1, 26:1, 28:1, ou 30:1. Em algumas modalidades, a razão N:P pode ser de cerca de 2:1 a cerca de 8:1. Por exemplo, a razão N:P pode ser de cerca de 3,0:1, cerca de 3,5:1, cerca de 4,0:1, cerca de 4,5:1, cerca de 5,0:1, cerca de 5,5:1, cerca de 5,67:1, cerca de 6,0:1, cerca de 6,5:1 ou cerca de 7,0:1. Em algumas modalidades, a razão N:P pode ser de cerca de 3:1. Em algumas modalidades, a razão N:P pode ser de cerca de 5,67:1.

[0128] Nanopartículas lipídicas podem ser preparadas usando métodos bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Belliveau et al., "Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA," *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2012, 1(8):e37; Zhi-

galtsev et al., Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing," *Langmuir*, 2012, 28(7):3633-3640).

[0129] Em algumas modalidades, as nanopartículas podem compreender adicionalmente um excipiente farmacologicamente aceitável, que, tal como no presente documento usado, inclui, mas não se limita a, qualquer e todos de solventes, meios de dispersão, diluentes, ou outros veículos líquidos, auxiliares de dispersão ou suspensão, agentes tensoativos, agentes isotônicos, agentes espessantes ou emulsionantes, conservantes, e outros similares, tal como adequado para a forma de dosagem particular desejada. Os excipientes também podem incluir, sem limitação, polímeros, nanopartículas *core-shell*, peptídeos, proteínas, células, hialuronidase, miméticos de nanopartículas e suas combinações. Vários excipientes para formular composições farmacêuticas e técnicas para a preparação da composição são conhecidos na técnica (ver Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22ª Edição, Editado por Allen, Loyd V., Jr, Pharmaceutical Press; no presente documento incorporado como referência na sua integralidade). O uso de um meio excipiente convencional pode ser contemplado dentro do escopo da presente descrição, exceto na medida em que, como qualquer meio excipiente convencional, possa ser incompatível com uma substância ou seus derivados, tal como produzindo qualquer efeito biológico indesejável ou de outra forma interagindo de modo prejudicial com qualquer/quaisquer outro(s) componente(s) da composição farmacêutica.

[0130] Em algumas modalidades, as nanopartículas podem compreender uma quantidade farmacologicamente eficaz de um componente lipídico e um RNA modificado, em que as composições compreendem ainda um excipiente farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, o excipiente farmacologicamente aceitável é escolhido de um solvente, meios de dispersão, diluente, agente de dispersão, auxiliar de

suspensão, tensoativo, agente isotônico, agente espessante ou emulsionante, conservante, nanopartículas *core-shell*, polímero, peptídeo, proteína, célula, hialuronidase, e misturas dos mesmos. Em algumas modalidades, o solvente é um solvente aquoso. Em algumas modalidades, o solvente é um solvente não aquoso.

[0131] A presente descrição também fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma ou mais nanopartículas lipídicas compreendendo um componente lipídico e um RNA modificado, como descrito no presente documento, e um excipiente farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas compreendem uma pluralidade de nanopartículas lipídicas como no presente documento descritas e um excipiente farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, o excipiente farmacêuticamente aceitável é escolhido de um solvente, meios de dispersão, diluente, agente de dispersão, auxiliar de suspensão, tensoativo, agente isotônico, agente espessante ou emulsionante, conservante, nanopartículas *core-shell*, polímero, peptídeo, proteína, célula, hialuronidase, e misturas dos mesmos. Em algumas modalidades, o solvente é um solvente aquoso. Em algumas modalidades, o solvente é um solvente não aquoso.

7.5. Melhorando a Cicatrização de Feridas em um Sujeito

[0132] As vias de VEGF-A desempenham um papel central nos processos de cicatrização de feridas, incluindo a revascularização de tecidos danificados, melhorando a permeabilidade vascular e a formação de novos vasos sanguíneos. É um objetivo da presente descrição para o tratamento de sujeitos que sofrem de doenças resultantes de processos deficientes de cicatrização de feridas.

[0133] Em algumas modalidades, as nanopartículas de acordo com esta descrição são administradas a um sujeito que sofre de uma doença que afeta estruturas vasculares. As estruturas vasculares são mais fre-

quentemente lesionadas por trauma penetrante, queimaduras ou cirurgia. A diabetes prejudica numerosos componentes da cicatrização de feridas, e um paciente com cicatrização de feridas diabéticas tem geralmente um fluxo sanguíneo alterado devido a disfunção vascular. Consequentemente, um sujeito com úlcera de pele incluindo úlceras diabéticas tem normalmente uma cicatrização de feridas diminuída ou retardada. Em algumas modalidades, as nanopartículas como no presente documento descritas são administradas a um sujeito que sofre de diabetes. No contexto desta descrição, uma ferida pode ser, por exemplo, uma ferida cirúrgica, uma queimadura, uma ferida abrasiva, um local de biópsia da pele, uma ferida crônica, uma lesão (por exemplo, uma ferida de lesão traumática), uma ferida de enxerto, uma ferida diabética, uma úlcera diabética (por exemplo, úlcera de pé diabético), uma úlcera por pressão, escaras e suas combinações.

[0134] Em algumas modalidades, as nanopartículas compreendendo um componente lipídico e um RNA modificado (por exemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 5) podem ser usadas para melhorar a cicatrização de feridas em um tecido de mamífero ou em um sujeito.

[0135] Em algumas modalidades, as nanopartículas como no presente documento descritas podem ser usadas para induzir neovascularização em um tecido de mamífero ou em um sujeito. Em algumas modalidades, as nanopartículas como no presente documento descritas podem ser usadas para induzir angiogênese em um tecido de mamífero ou em um sujeito.

[0136] No entanto, em algumas modalidades, as nanopartículas como no presente documento descritas podem ser usadas para tratar uma lesão vascular de trauma ou cirurgia. Em algumas modalidades, as nanopartículas como no presente documento descritas podem ser usadas para tratar uma doença que envolve enxerto de pele e enxerto de

tecido.

[0137] Outros aspectos da descrição referem-se à administração das nanopartículas a sujeitos em sua necessidade. Em algumas modalidades, as nanopartículas como no presente documento descritas são administradas por uma via intradérmica para melhorar a cicatrização de feridas de um tecido ou de um mamífero.

[0138] Em certas modalidades, as nanopartículas como no presente documento descrito podem ser administradas a níveis de dosagem suficientes para entregar cerca de 0,0001 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, cerca de 0,001 mg/kg a cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,005 mg/kg a cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,001 mg/kg a cerca de 0,005 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, ou cerca de 1 mg/kg a cerca de 25 mg/kg, de RNA modificado por peso corporal do sujeito por dia, uma ou mais vezes ao dia, para se obter o efeito terapêutico desejado.

[0139] Em algumas modalidades, as nanopartículas como no presente documento descritas são administradas a um sujeito em uma única administração. Em algumas modalidades, as nanopartículas, como no presente documento descritas, são administradas ao sujeito, a uma dosagem fixa em múltiplas (por exemplo, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete, dezoito, dezanove, vinte, ou mais) administrações. Em cada uma das modalidades neste parágrafo, as "administrações múltiplas" podem ser separadas umas das outras por intervalos de tempo curtos (1-5 min), médios (6-30 minutos), ou longos (mais de 30 minutos, horas, ou mesmo dias).

[0140] As nanopartículas podem ser administradas a um sujeito

usando qualquer dosagem de administração eficaz para tratar uma doença, distúrbio e/ou afeção. A dosagem exata necessária irá variar de sujeito para sujeito, dependendo da espécie, idade, e condição geral do sujeito, da gravidade da doença, da formulação particular, seu modo de administração, seu modo de atividade, e outros similares. Será entendido, porém, que o uso diário total das composições pode ser decidido pelo médico assistente dentro do escopo do bom senso médico. O nível de dose farmacologicamente eficaz específico para qualquer paciente em particular dependerá de uma variedade de fatores, incluindo a gravidade da doença, a composição específica aplicada, a idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do paciente, o tempo de administração, via de administração, a duração do tratamento e fatores similares bem conhecidos nas técnicas médicas.

[0141] Todas as reivindicações na listagem de reivindicações são no presente documento incorporadas como referência no relatório descritivo, na sua integralidade como modalidades adicionais.

8. EXEMPLOS

8.1. EXEMPLO 1

Preparação de Nanopartículas e Composições Salinas de Citrato

[0142] Lipídeos e RNA modificados: Solução estoque de lipídeos em etanol foi preparada a partir de um Composto A, fosfatidilcolina de distearoílo (DSPC, Avanti Polar Lipids), colesterol (Sigma) e um lipídeo de polietilenoglicol modificado (mPEG₂₀₀₀-DMG de NOF Corporation). Os lipídeos foram misturados em etanol 99,5% até uma concentração lipídica total de 12,5 mM. A composição foi o Composto A, DSPC, colesterol, DMG-PEG na razão de 50:10:38,5:1,5% mol. O RNA modificado de VEGF-A (por exemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 5) foi descongelado e diluído para 6,25 mM em tampão acetato de sódio e água HyClone em concentrações correspondendo a uma razão de carga (N:P) de 5,67 ou 3 na formulação final. As

formulações finais após a diluição foram as seguintes:

LNP 1:11 (N:P=3), concentração de mRNA de 0,06 mg/mL

| Componente LNP | Quantidade (mg/mL) |
|--------------------------|---------------------------|
| RNA modificado de VEGF-A | 0,06 |
| Composto A | 0,37 |
| DSPC | 0,08 |
| Colesterol | 0,16 |
| DMG-PEG | 0,04 |

LNP 1:20 (N:P=5,67), concentração de mRNA de 0,06 mg/mL

| Componente LNP | Quantidade (mg/mL) |
|--------------------------|---------------------------|
| RNA modificado de VEGF-A | 0,06 |
| Composto A | 0,70 |
| DSPC | 0,16 |
| Colesterol | 0,30 |
| DMG-PEG | 0,07 |

[0143] Composições nanopartículas lipídicas (LNP): As composições LNP foram preparadas misturando-se rapidamente uma solução de etanol contendo os lipídeos e solução aquosa de RNA modificado de VEGF-A em um dispositivo de microfluidos, seguido por diálise em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Resumidamente, a solução de RNA modificado de VEGF-A e a solução lipídica foram injetadas em um dispositivo de mistura microfluídica em uma razão volumétrica de aquosa para etanol 3:1 e taxas de fluxo de 12-14 mL/min usando duas seringas, que foram controladas por bombas de seringa. O etanol foi removido por diálise das composições de LNP contra tampão PBS durante a noite usando membranas com 10 KD de ponto de corte. Composições de LNP foram concentradas usando dispositivos de filtragem por centrifugação com 30 KD de ponto de corte e caracterizado pelo tamanho de partícula (72 nm), a concentração de RNA modificado de

VEGF-A (0,35 mg/mL), o índice de polidispersidade (0,14) e encapsulação (94%). Composições de LNP foram diluídas para a concentração final de 0,33 mg/mL com PBS e esterilizadas por filtração. As composições de LNP foram armazenadas sob refrigeração.

[0144] Composições salinas de citrato: Composições salinas de citrato foram preparadas diluindo solução de RNA modificado de VEGF-A descongelada com água HyClone e uma solução tampão concentrada a uma composição final de citrato de sódio 10 mM e cloreto de sódio 130 mM a pH 6,5.

8.2. EXEMPLO 2

Avaliação de Produção de Proteína VEGF-A Humana Após Injeção Intradérmica de RNA Modificado de VEGF-A Humana em Camundongo

[0145] Nanopartículas e composições salinas de citrato compreendendo um RNA Modificado de VEGF-A e Composto A foram preparados como no Exemplo 1. Neste exemplo, o RNA Modificado de VEGF-A tinha a sequência de SEQ ID NO: 3.

[0146] Camundongos machos db/db (C57BL/6J, BKS.Cg-m+/+Leprdb/BomTac homozigóticos, Taconic Dinamarca) foram anestesiados com isoflurano. Estes camundongos são um modelo estabelecido de diabetes do Tipo II e têm a cicatrização de feridas comprometida, em comparação com os camundongos de tipo selvagem. Os camundongos foram rapados e o pelo restante foi removido com creme depilatório. Tanto o RNA modificado de VEGF-A (100 µg) formulado em solução salina de citrato ou o RNA modificado de VEGF-A (3 µg) formulado em LNP (Ver Exemplo 1) foi injetado por via intradérmica de 4 injeções separadas (10 µL cada, volume total de 40 µL) dentro de uma área circular de 0,785 mm². Em pontos de tempo pré-definidos após as injeções intradérmicas, os camundongos foram anestesiados e as áreas da

pele injetada foram amostradas e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a 80 °C. Todas as amostras foram analisadas quanto à proteína VEGF- A humana.

[0147] As amostras de camundongo db/db injetados com 100 µg de RNA modificado de VEGF-A formulado em solução salina de citrato foram tiradas 6, 24, 48, 72, e 144 horas após a injeção. As amostras de camundongos db/db injetados com 3 µg de RNA modificado de VEGF-A formulado em LNP foram colhidas às 3, 6, 24, 48, 72, 144 horas após a injeção.

Quantificação da Proteína VEGF-A Humana em Pele de Camundongo

[0148] Para preparar as amostras de pele para análise do conteúdo de proteína VEGF-A humana, foi adicionado tampão de lise Tris contendo inibidores da fosfatase I e II e inibidor da protease (Meso Scale Discovery (MSD), Rockville, MD, EUA) às biópsias de tecidos congeladas e se congelou a aproximadamente 20 °C antes da homogeneização. Adicionou-se de seguida esferas de aço inoxidável (3 mm) e as amostras foram homogeneizadas usando o instrumento de homogeneização Precellys. Os homogenatos foram centrifugados e os sobrenadantes armazenados a 80°C antes de análise.

[0149] As concentrações de VEGF-A humana foram determinadas usando um imunoenensaio do tipo sanduíche com detecção eletroquímica luminescente. O kit de ensaio de VEGF-A humana MSD® 96-poços MULTI-ARRAY® (Mesoscale, Rockville, Maryland) foi usado para medir a concentração de VEGF-A nos homogenatos de tecido. Este ensaio detecta apenas a proteína VEGF-A humana e, portanto, serve para testar apenas a VEGF-A expressa a partir do RNA modificado. O ensaio foi efetuado de acordo com as instruções do *kit*. Os padrões foram diluídos em série em diluentes de MSD. As amostras com elevada concentração foram diluídas com diluentes MSD antes da análise para se ajustar no

interior da curva padrão e as placas foram lidas no Meso Scale Discovery's Sector Imager 6000.

Resultados

[0150] FIG. 3 e 4 resumem os perfis de tempo e magnitude da produção de proteína VEGF-A humana após injeção intradérmica de RNA modificado de VEGF-A formulado em solução salina de citrato (100 µg) e LNP (3 µg), respectivamente. Houve uma produção eficiente de proteínas em 6 e 3 horas, respectivamente (FIG. 4). Em particular, a composição de LNP resultou na produção de mais de cerca de 400 pg/mg de proteína VEGF-A dentro de 8 horas (FIG. 4). Além disso, a composição de LNP resultou na produção de mais de cerca de 1 pg/mg de proteína VEGF-A até 6 dias (FIG. 3). Produção de proteína VEGF-A foi substancialmente aumentada quando o RNA modificado de VEGF-A foi formulado em LNP em comparação com a solução salina de citrato de (FIGs. 3 e 4).

[0151] A Tabela 2 resume os parâmetros farmacocinéticos obtidos após a injeção intradérmica de RNA modificado de VEGF-A, formulado em solução salina de citrato (100 µg) e LNP (3 µg). A C_{max} foi aumentada 13,7 vezes para RNA modificado de VEGF-A formulado em LNP apesar do facto de que a dose foi de apenas 3% do RNA modificado de VEGF-A formulado em solução salina de citrato. A área total sob a curva de concentração, AUC_{0-t} , foi aumentada 6,6 vezes com 3 µg de RNA modificado de VEGF-A formulado em LNP em comparação com 100 µg de RNA modificado de VEGF-A formulado em solução salina de citrato.

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir das concentrações de VEGF-A humana obtidas nas duas séries temporais com RNA modificado de VEG F-A humana formulado em solução salina de citrato e em LNP, respectivamente. A área total sob a curva de concentração AUC_{0-t}) foi calculada com base no perfil mediano nos pontos de dados medidos até 144 horas após a dose.

| Grupo | Dose (μg) | T_{max} (h) | C_{max} (pg/mg tecido) | $AUC_{(0-t)}$ (pg*h/mg tecido) | $t_{1/2}$ (h) |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| LNP | 3 | 6 | 424 | 5296 | 50 |
| Solução sa- lina de citrato | 100 | 24 | 31 | 806 | 40 |

8.3. EXEMPLO 3

Efeitos na Cicatrização de Feridas Após Injeção Intradérmica de RNA Modificado de VEGF-A humana

Materiais e Métodos

[0152] Nanopartículas lipídicas e composições salinas de citrato compreendendo um RNA Modificado de VEGF-A e Composto A foram preparados como no Exemplo 1. Neste exemplo, o RNA Modificado de VEGF-A tinha a sequência de SEQ ID NO: 4. Além disso, um RNA modificado de VEGF-A não traduzível (SEQ ID NO: 6) foi usado para formular certas nanopartículas ou composições salinas de citrato, como indicado nas figuras.

[0153] Os camundongos db/db machos com 12 semanas de idade (B6.BKS(D)-Leprdb/J) da Jackson Lab USA foram analisados quanto à glicemia após 4 h de jejum e depois randomizados em grupos de tratamento. Os camundongos foram anestesiados com isoflurano. A superfície dorsal de cada camundongo foi rapada com uma máquina de cortar cabelo elétrica seguida de um agente depilatório para remover os pelos restantes. A pele foi lavada com descutan e etanol. Uma ferida de espessura total na parte de trás de cada camundongo foi criada por uma marca com uma punção de biópsia de 10 mm e, em seguida, cortada em condições esterilizadas e coberta com uma bandagem de Tegaderm. No dia 3 após o ferimento, a bandagem de Tegaderm foi removida. A nanopartícula ou a composição salina de citrato foi injetada intradermicamente como 4 injeções separadas (10 μL cada, volume total 40 μL) em posições próximas à margem da ferida. A ferida foi então coberta por uma nova bandagem Tegaderm. Durante o período de ob-

servação, os camundongos foram mantidos separados para evitar interferência na cicatrização de feridas.

[0154] A cicatrização da ferida foi determinada a partir de uma série temporal (isto é, todos os 3/4 dias até ao dia 17 após o ferimento) de fotografias digitais tiradas a uma distância fixa e com uma iluminação indireta. A área da ferida foi determinada traçando a margem da ferida usando o software de análise de imagem Image J e depois calculada como uma área percentual da área da linha de base no dia 3 após o ferimento, imediatamente antes da dosagem.

[0155] A avaliação estatística foi realizada com um teste t não-pareado de dois lados, e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

[0156] Como mostrado na FIG. 5, no dia 7, uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 1 μg ou 3 μg de RNA modificado de VEGF-A melhorou significativamente a cicatrização de feridas quando comparada a uma composição de nanopartícula lipídica compreendendo 3 μg de VEGF-A não traduzível, bem como uma composição salina de citrato compreendendo 100 μg de RNA modificado de VEGF-A. Adicionalmente, no dia 10, a composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 1 μg ou 3 μg de RNA modificado de VEGF-A melhorou significativamente a cicatrização de feridas quando comparada à composição de nanopartícula lipídica compreendendo 3 μg de RNA modificado de VEGF-A não traduzível. No dia 10, não foi observada diferença significativa entre a composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 1 μg ou 3 μg de RNA modificado de VEGF-A e a composição salina de citrato compreendendo 100 μg de RNA modificado de VEGF-A.

[0157] Em uma experiência separada, como mostrado na FIG. 6, no dia 7, uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3

μg de RNA modificado de VEGF-A melhorou significativamente a cicatrização de feridas quando comparada a uma composição de nanopartícula lipídica compreendendo 3 μg de RNA modificado de VEGF-A não traduzível, bem como uma composição salina de citrato que não compreende qualquer RNA modificado de VEGF-A. Adicionalmente, no dia 10, a composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 μg de RNA modificado de VEGF-A melhorou significativamente a cicatrização de feridas quando comparada à composição de nanopartícula lipídica compreendendo 3 μg de RNA modificado de VEGF-A não traduzível.

[0158] A FIG. 7 mostra outra experiência de cicatrização de feridas. No dia 7, uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 μg de RNA modificado de VEGF-A melhorou significativamente a cicatrização de feridas quando comparada a uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 μg de RNA modificado de GFP, uma composição de nanopartículas lipídicas que não compreende RNA modificado ou composição salina de citrato que não compreende nenhum RNA modificado. Além disso, no dia 10, a composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 μg de RNA modificado por VEGF-A melhorou significativamente a cicatrização de feridas quando comparada com a composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 μg de RNA modificado de GFP.

[0159] Como mostrado na FIG. 8, no dia 7 ou no dia 10, não houve diferenças significativas na cicatrização de feridas após injeções intradérmicas das quatro composições a seguir: (1) uma composição de nanopartículas lipídicas compreendendo 3 μg de RNA modificado de VEGF-A não traduzível, (2) uma composição salina de citrato compreendendo 100 μg de RNA modificado de VEGF-A, (3) uma composição salina de citrato compreendendo 100 μg de RNA modificado de VEGF-A não traduzível e (4) uma composição salina de citrato que não compreende nenhum RNA modificado.

9. SEQUÊNCIAS

[0160] 9.1. SEQ ID NO: 1: Um RNA modificado codificando VEGF-A

5'^{7Me}G_{ppp}G_{2'}OMeGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGA-
 GUAAGAAGAAUAUAAGAGCCACCAUGAACUUUCUG-
 CUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUACCUCC
 ACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAGGAGG
 AGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUCUAU
 CAGCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAGACCCUGGUGGACAUCU
 UCCAGGAGUACCCUGAUGAGAUCGAGUACAUCUUCAAGCCAUCC
 UGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGCAAUGACGAG
 GGCCUGGAGUGUGUGCCCACUGAGGAGUCCAACAUCACCAUGC
 AGAUUAUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAG
 AUGAGCUUCCUACAGCACAACAAAUGUGAAUGCAGACCAAAGAA
 AGAUAGAGCAAGACAAGAAAAUCCCUGUGGGCCUUGCUCAGAGC
 GGAGAAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUCCGCAGACGUGUAAAUG
 UUCCUGCAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGCUU
 GAGUUAAACGAACGUACUUGCAGAUGUGACAAGCCGAGGCGGU
 GAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUG
 GGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCC
 CGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAAAAAAAAAAAAA
 AA
 AAUCUAG_o

H3' (SEQ ID NO: 1)

Em que:

A, C, G & U= AMP, CMP, GMP & N1-metil-pseudoUMP,
 respectivamente

Me = metila

p = fosfato inorgânico

Em que:

A, C, G & U= AMP, CMP, GMP & N1-metil-pseudoUMP,
respectivamente

Me = metila

p = fosfato inorgânico

[0163] **9.4. SEQ ID NO: 4: Um RNA modificado codificando VEGF-A (VEGF-01-012)**

5'^{7Me}G_{ppp}GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGA-
GUAAGAAGAAUAUAAGAGCCACCAUGAACUUU-
CUCCUUUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGUUACUCUACC
UCCACCACGCCAAGUGGUCCCAGGCCGCACCCAUGGCAGAAGG
AGGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGACGUC
UAUCAGCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAGACACUGGUGGACA
UCUUCCAGGAGUACCCUGAUGAGAUCGAGUACAUCUUCAAGCCA
UCCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGCGGCUGCUGCAAUGACG
AGGGCCUGGAGUGUGGCCUACUGAGGAGUCCAACAUCACCAU
GCAGAUUAUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAGGAG
AGAUGAGCUUCCUACAGCACAACAAAUGUGAAUGCAGACCAAAG
AAAGAUAGAGCAAGACAAGAGAAUCCUGUGGGCCUUGCUCAGA
GCGGAGAAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUCGCGCAGACGUGUAAA
UGUUCCUGCAAGAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGC
UUGAGUUAAACGAACGUACUUGCAGAUGUGACAAGCCGAGGCG
GUGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCU
UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC
CCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAAAAAAAAAA
AA
AAAUCUA
G3' (SEQ ID NO: 4)

Em que:

A, C, G & U= AMP, CMP, GMP & N1-metil-pseudoUMP,

respectivamente

p = fosfato inorgânico

[0164] **9,5. SEQ ID NO: 5: Um RNA modificado codificando VEGF-A**

5'^{7Me}G_{ppp}AGGAAUAAGAGAGAAAAGAAGA-
 GUAAGAAGAAUAUAAGAGCCACCAUGAACUUU-
 CUGCUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUACC
 UCCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAGG
 AGGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUC
 UAUCAGCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAGACCCUGGUGGACA
 UCUUCCAGGAGUACCCUGAUGAGAUCGAGUACAUCUUAAGCCA
 UCCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGCAAUGAC
 GAGGGCCUGGAGUGUGUGCCCACUGAGGAGUCCAACAUCACCA
 UGCAGAUUAUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAGGA
 GAGAUGAGCUUCCUACAGCACAACAAAUGUGAAUGCAGACCAA
 GAAAGAUAGAGCAAGACAAGAAAUCCCUGUGGGCCUUGCUCAG
 AGCGGAGAAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUCCGCAGACGUGUAAA
 UGUUCCUGCAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGC
 UUGAGUUAAACGAACGUACUUGCAGAUGUGACAAGCCGAGGCG
 GUGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUCUUCUUGCCCCU
 UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCUCCUGCACCCGUACC
 CCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAAAAAAAAAA
 AA
 AAAUCUA
 G3' (SEQ ID NO: 5)

Em que:

A, C, G & U= AMP, CMP, GMP & N1-metil-pseudoUMP,
 respectivamente

p = fosfato inorgânico

[0165] **9,6. SEQ ID NO: 6: Um RNA modificado de VEGF-A não**

traduzível

5'⁷MeG_{ppp}GGGAAAUAGAGAGAAAAGAAGA-
GUAAGAAGAAAUUAUAAGAGCCACCACGAACUUU-
GUGCUCUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUCUCUACC
UCCACCACGCCAAGUGGUCCCAGGCCGCACCCACGGCAGAAGG
AGGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCACGGACGUC
UAUCAGCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAGACCCUCGUGGACA
UCUUCCAGGAGUACCCUCACGAGAUCGAGUACAUCUUAAGCCA
UCCUGUGUGCCCCUGACGCGACGCGGGGGCUGCUGCAACGAC
GAGGGCCUCGAGUGUGUGCCCACCGAGGAGUCCAACACCACCA
CGCAGAUUACGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCACAUAGGA
GAGACGAGCUUCCUACAGCACAACAAACGUGAACGCAGACCAA
GAAAGAUAGAGCAAGACAAGAAAAUCCCUGUGGGCCUUGCUCAG
AGCGGAGAAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUCCGCAGACGUGUAAA
CGUUCCUGCAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGC
UUGAGUUAAACGAACGUACUUGCAGACGUGACAAGCCGAGGCG
GUGAUAAUAGGUUGGAGCCUCGGUGGCCACGCUUCUUGCCCCU
UGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACC
CCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAAAAAAAAAA
AA
AAA3'

(SEQ ID NO: 6)

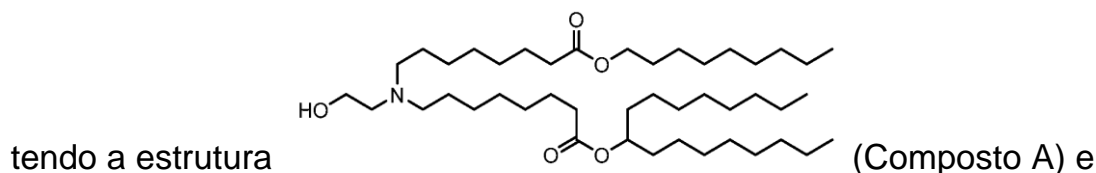
Em que:

A, C, G & U= AMP, CMP, GMP & N1-metil-pseudoUMP,
respectivamente

p = fosfato inorgânico

REIVINDICAÇÕES

1. Nanopartícula, caracterizada pelo fato de compreender
(i) um componente lipídico compreendendo um composto



- (ii) um RNA modificado compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 e 3-5, codificando um polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2.

2. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o componente lipídico compreende ainda um fosfolípido, um lipídeo estrutural e/ou um lipídeo PEG.

3. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o fosfolípido é selecionado do grupo consistindo em 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diundecanoil-sn-glicero-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0 Diéter PC), 1-oleoil-2-colesteril-hemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemPC), 1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 Liso PC), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16,0 PE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sódio (DOPG), esfingomiélna e suas misturas;

o lipídeo estrutural é selecionado do grupo consistindo em colesterol, fecosterol, sitosterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, tomatidina, ácido ursólico, alfa-tocoferol e suas misturas; e/ou

o lipídeo PEG é selecionado do grupo consistindo em uma fosfatidiletanolamina modificada com PEG, um ácido fosfatídico modificado com PEG, uma ceramida modificada com PEG, uma dialquilamina modificada com PEG, um diacilglicerol modificado com PEG, um dialquilglicerol modificado com PEG e suas misturas.

4. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o componente lipídico compreende ainda um fosfolipídeo que é DSPC, um lipídeo estrutural que é colesterol e/ou um lipídeo PEG que é PEG-DMG.

5. Nanopartícula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a razão N:P é de cerca de 2:1 a cerca de 30:1.

6. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a razão N:P é de cerca de 5,67:1.

7. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a razão N:P é de cerca de 3:1.

8. Nanopartícula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1 a cerca de 100:1.

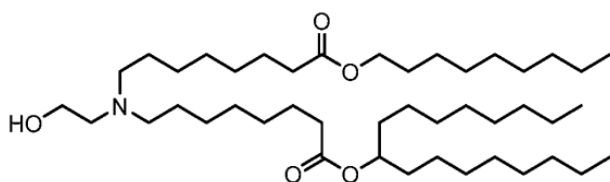
9. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 20:1.

10. Nanopartícula, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1.

11. Nanopartícula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a nanopartícula tem um diâmetro médio de cerca de 50 nm a cerca de 100 nm.

12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender

(a) pelo menos uma nanopartícula compreendendo (i) um componente lipídico compreendendo um composto com a estrutura



(Composto A) e (ii) um RNA

modificado compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 e 3-5, codificando um polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2; e

b) um excipiente farmacêuticamente aceitável.

13. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o componente lipídico compreende ainda um fosfolípido, um lipídeo estrutural e/ou um lipídeo PEG.

14. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o fosfolípido é selecionado do grupo consistindo em 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diundecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0 Diéter PC), 1-oleoil-2-colesterol-hemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemPC), 1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 Liso PC), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosa-hexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

(ME 16,0 PE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoilenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosahexaenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sódio (DOPG), esfingomielina e suas misturas;

o lipídeo estrutural é selecionado do grupo consistindo em colesterol, fecosterol, sitosterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, tomatidina, ácido ursólico, alfa-tocoferol e suas misturas; e/ou

o lipídeo PEG é selecionado do grupo consistindo em uma fosfatidiletanolamina modificada com PEG, um ácido fosfatídico modificado com PEG, uma ceramida modificada com PEG, uma dialquilamina modificada com PEG, um diacilglicerol modificado com PEG, um dialquilglicerol modificado com PEG e suas misturas.

15. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o componente lipídico compreende ainda um fosfolipídeo que é DSPC, um lipídeo estrutural que é colesterol e/ou um lipídeo PEG que é PEG-DMG.

16. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12, 13, 14 ou 15, caracterizada pelo fato de que a razão N:P é de cerca de 2:1 a cerca de 30:1.

17. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a razão N:P é de cerca de 5,67:1.

18. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a razão N:P é de cerca de 3:1.

19. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 18, caracterizada pelo fato de que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1 a cerca de 100:1.

20. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 20:1.

21. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1.

22. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 21, caracterizada pelo fato de que a nanopartícula tem um diâmetro médio de cerca de 50 nm a cerca de 100 nm.

23. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 22, caracterizada pelo fato de que, quando administrada a um tecido de mamífero ou a um sujeito, a composição farmacêutica resulta em uma concentração máxima observada no plasma e/ou tecido, C_{max} , do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 até cerca de 450 pg/mL de plasma ou pg/mg de tecido.

24. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 22, caracterizada pelo fato de que, quando administrada a um tecido de mamífero ou a um sujeito, a composição farmacêutica resulta em uma área total de plasma e/ou tecido sob a curva de concentração, AUC_{0-t} , do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 até cerca de 5,500 pg*h/mL de plasma ou pg*h/mg de tecido.

25. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 22, caracterizada pelo fato de que, quando administrada a um tecido de mamífero ou a um sujeito, a composição farmacêutica resulta na produção de mais do que cerca de 400 pg/mg de tecido do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 dentro de 8 horas.

26. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 22, caracterizada pelo fato de que, quando administrada a um tecido de mamífero ou a um sujeito, a composição farmacêutica resulta na produção de mais do que cerca de 1 pg/mg de

tecido do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 durante até 6 dias.

27. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o excipiente farmacêuticamente aceitável é escolhido de um solvente, meios de dispersão, diluente, agente de dispersão, auxiliar de suspensão, tensoativo, agente isotônico, agente espessante ou emulsionante, conservante, polímero, peptídeo, proteína, célula, hialuronidase e suas misturas.

28. Método para promover e/ou melhorar a cicatrização de feridas em um sujeito, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao sujeito uma quantidade eficaz da nanopartícula, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou a composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 12 a 27.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que o componente lipídico da nanopartícula compreende ainda um fosfolípídeo, um lipídeo estrutural e um lipídeo PEG.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que o fosfolípídeo é selecionado do grupo consistindo em 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diundecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0 Diéter PC), 1-oleoil-2-colesteril-hemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemPC), 1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 Liso PC), 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diaraquidonil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16,0 PE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-

fosfoetanolamina, 1,2-dilinoleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosa-hexaenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sódio (DOPG), esfingomiéline e suas misturas;

o lipídeo estrutural é selecionado do grupo consistindo em colesterol, fecosterol, sitosterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, tomatidina, ácido ursólico, alfa-tocoferol e suas misturas; e/ou

o lipídeo PEG é selecionado do grupo consistindo em uma fosfatidiletanolamina modificada com PEG, um ácido fosfatídico modificado com PEG, uma ceramida modificada com PEG, uma dialquilamina modificada com PEG, um diacilglicerol modificado com PEG, um dialquilglicerol modificado com PEG e suas misturas.

31. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que o componente lipídico compreende ainda um fosfolipídeo que é DSPC, um lipídeo estrutural que é colesterol e/ou um lipídeo PEG que é PEG-DMG.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 31, caracterizada pelo fato de que a razão N:P da nanopartícula é de cerca de 2:1 a cerca de 30:1.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de que a razão N:P da nanopartícula é de cerca de 5,67:1.

34. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de que a razão N:P da nanopartícula é de cerca de 3:1.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 34, caracterizada pelo fato de que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1 a cerca de 100:1.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizada pelo fato de que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 20:1.

37. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizada pelo fato de que a razão p/p do componente lipídico para o RNA modificado é de cerca de 10:1.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 37, caracterizada pelo fato de que a nanopartícula tem um diâmetro médio de cerca de 70 nm a cerca de 80 nm.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que a nanopartícula tem um diâmetro médio de cerca de 72 nm.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 39, caracterizada pelo fato de que a administração resulta em uma concentração máxima observada no plasma e/ou tecido, C_{max} , do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 até cerca de 450 pg/mL de plasma ou pg/mg de tecido.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 39, caracterizada pelo fato de que a administração resulta em uma área total de plasma e/ou tecido sob a curva de concentração, AUC_{0-t} , do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 até cerca de 5,500 pg*h/mL de plasma ou pg*h/mg de tecido.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 39, caracterizada pelo fato de que a administração resulta na produção de mais do que cerca de 400 pg/mg de tecido do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 dentro de 8 horas.

43. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 39, caracterizada pelo fato de que a administração resulta na produção de mais do que cerca de 1 pg/mg de tecido do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 durante até 6 dias.

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 39, caracterizada pelo fato de que a nanopartícula ou a composição farmacêutica é administrada por via intradérmica.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 39, caracterizada pelo fato de que a concentração do RNA modificado é de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg.

46. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 39, caracterizada pelo fato de que a administração resulta em um aumento da produção do polipeptídeo VEGF-A da SEQ ID NO: 2 por um fator de cerca de 5 a cerca de 100, quando comparado com uma administração do RNA modificado em um tampão salino de citrato.

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 39, caracterizada pelo fato de que o sujeito sofre de diabetes.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 39, caracterizada pelo fato de que a ferida é uma ferida cirúrgica, uma queimadura, uma ferida abrasiva, um local de biópsia da pele, uma ferida crônica, uma lesão (por exemplo, uma ferida de lesão traumática), uma ferida de enxerto, uma ferida diabética, uma úlcera diabética (por exemplo, úlcera de pé diabético), uma úlcera por pressão, escaras e suas combinações.

49. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 39, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica compreende um excipiente farmacêuticamente aceitável, preferencialmente um solvente, meios de dispersão, diluente, agente de dispersão, auxiliar de suspensão, tensoativo, agente isotônico, agente espessante ou emulsionante, conservante, polímero, peptídeo, proteína, célula, hialuronidase e suas misturas.

50. Método para induzir neovascularização em um tecido de mamífero ou em um sujeito, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao tecido de mamífero ou sujeito uma quantidade eficaz da nanopartícula, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou a composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 12 a 27.

51. Método para induzir angiogênese em um tecido de mamífero ou em um sujeito, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao tecido de mamífero ou sujeito uma quantidade eficaz da nanopartícula, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou a composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 12 a 27.

52. Método para aumentar a densidade capilar e/ou arteríola em um tecido de mamífero ou em um sujeito, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao tecido de mamífero ou sujeito uma quantidade eficaz da nanopartícula, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou a composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 12 a 27.

FIG. 1

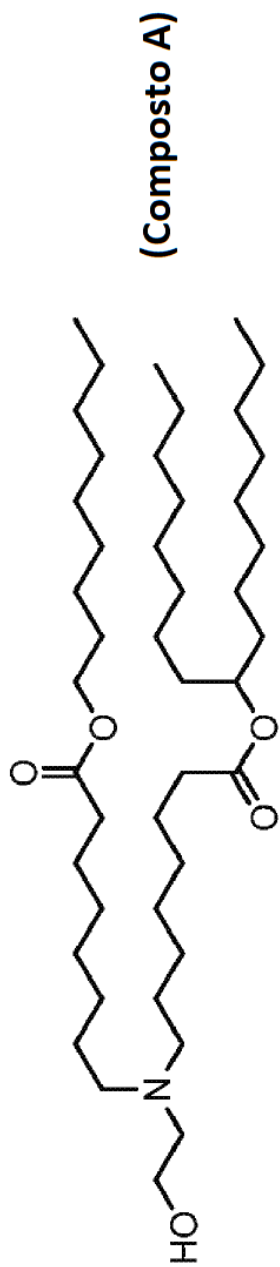
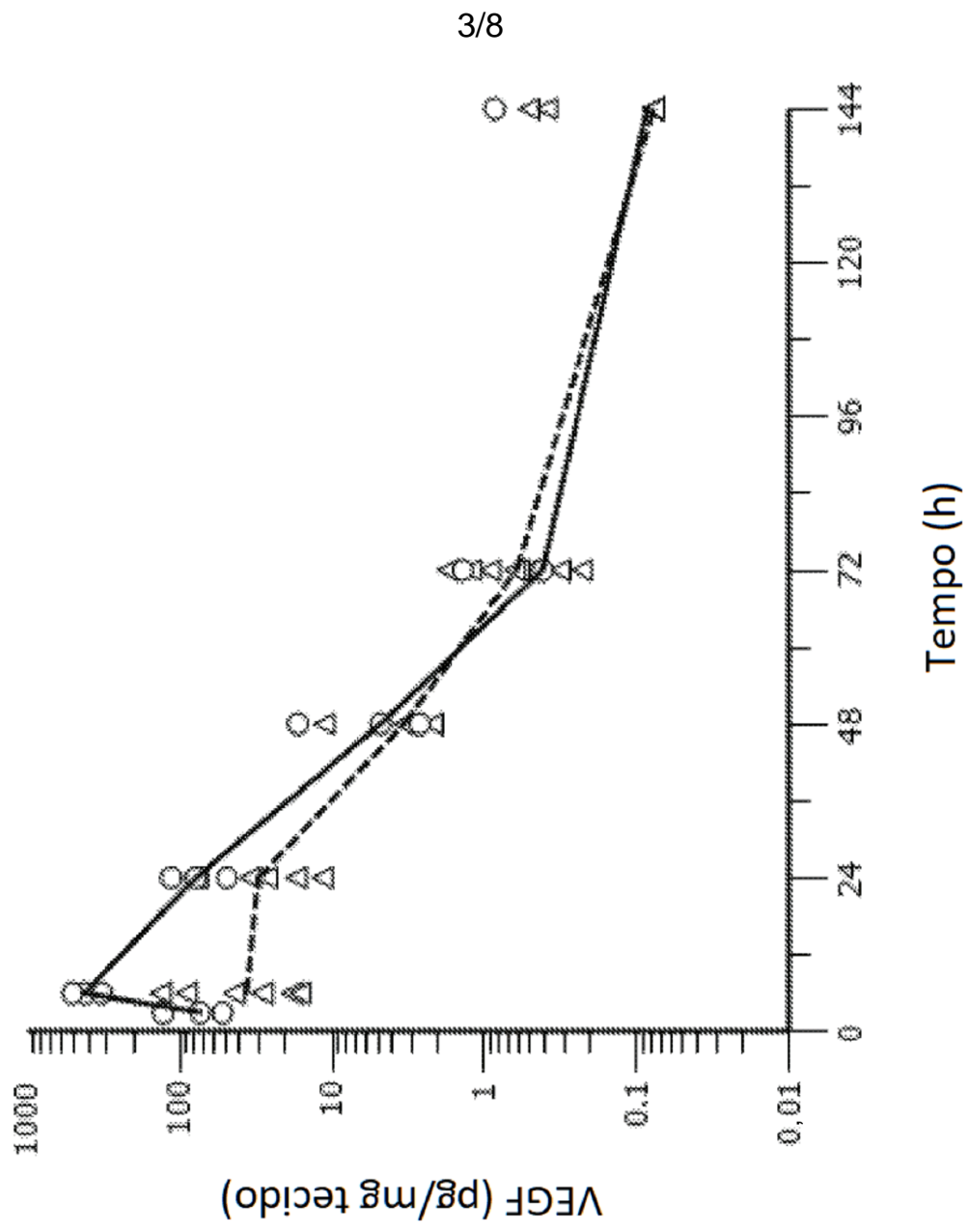


FIG. 3



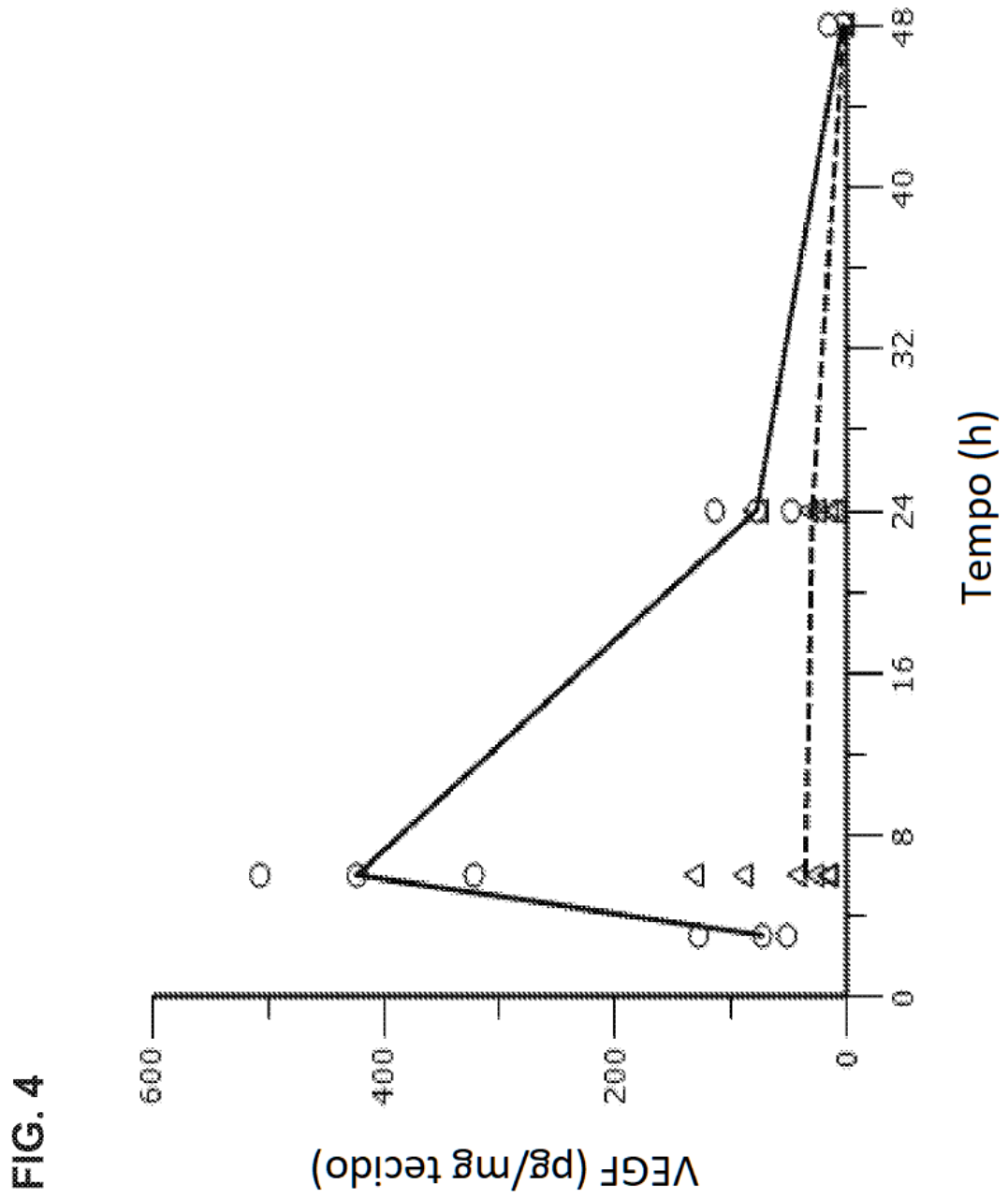


FIG. 5

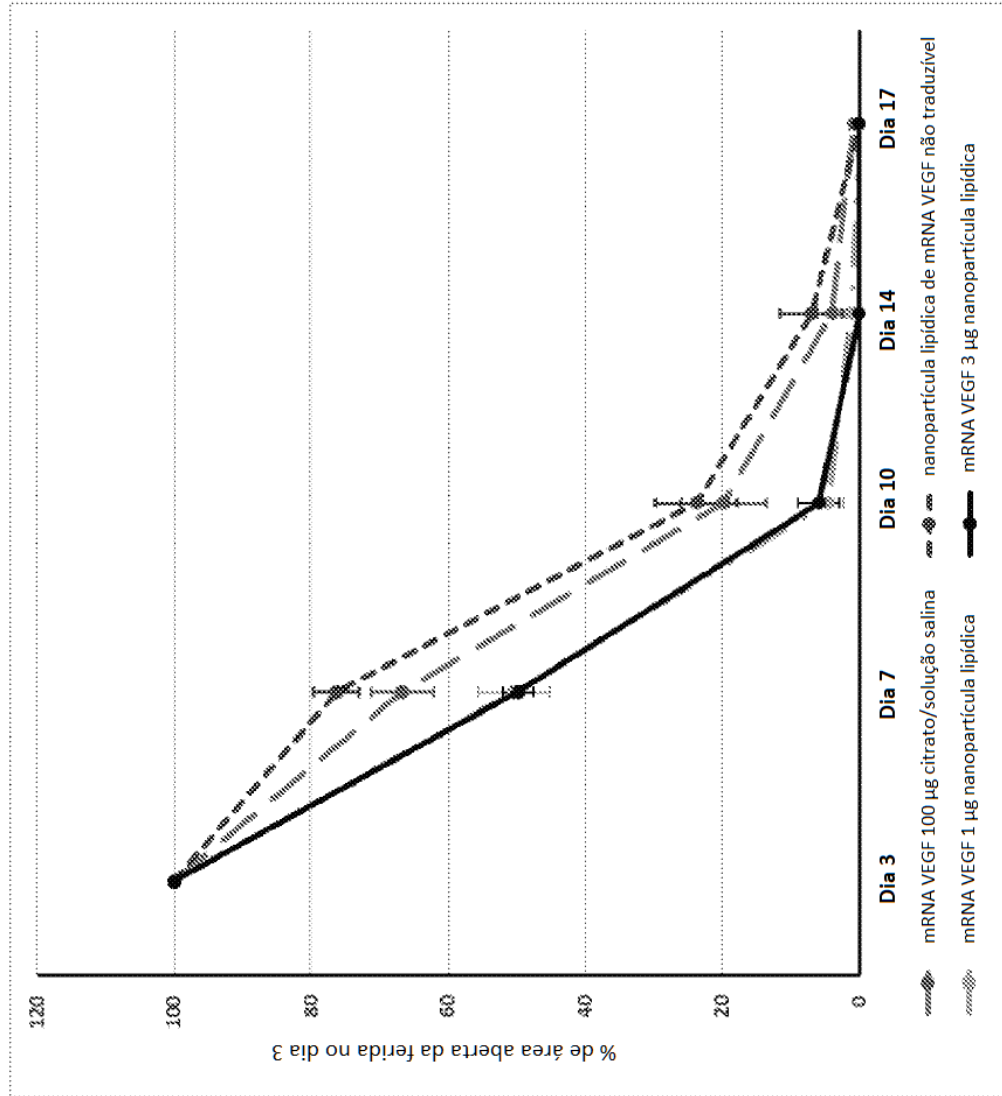


FIG. 7

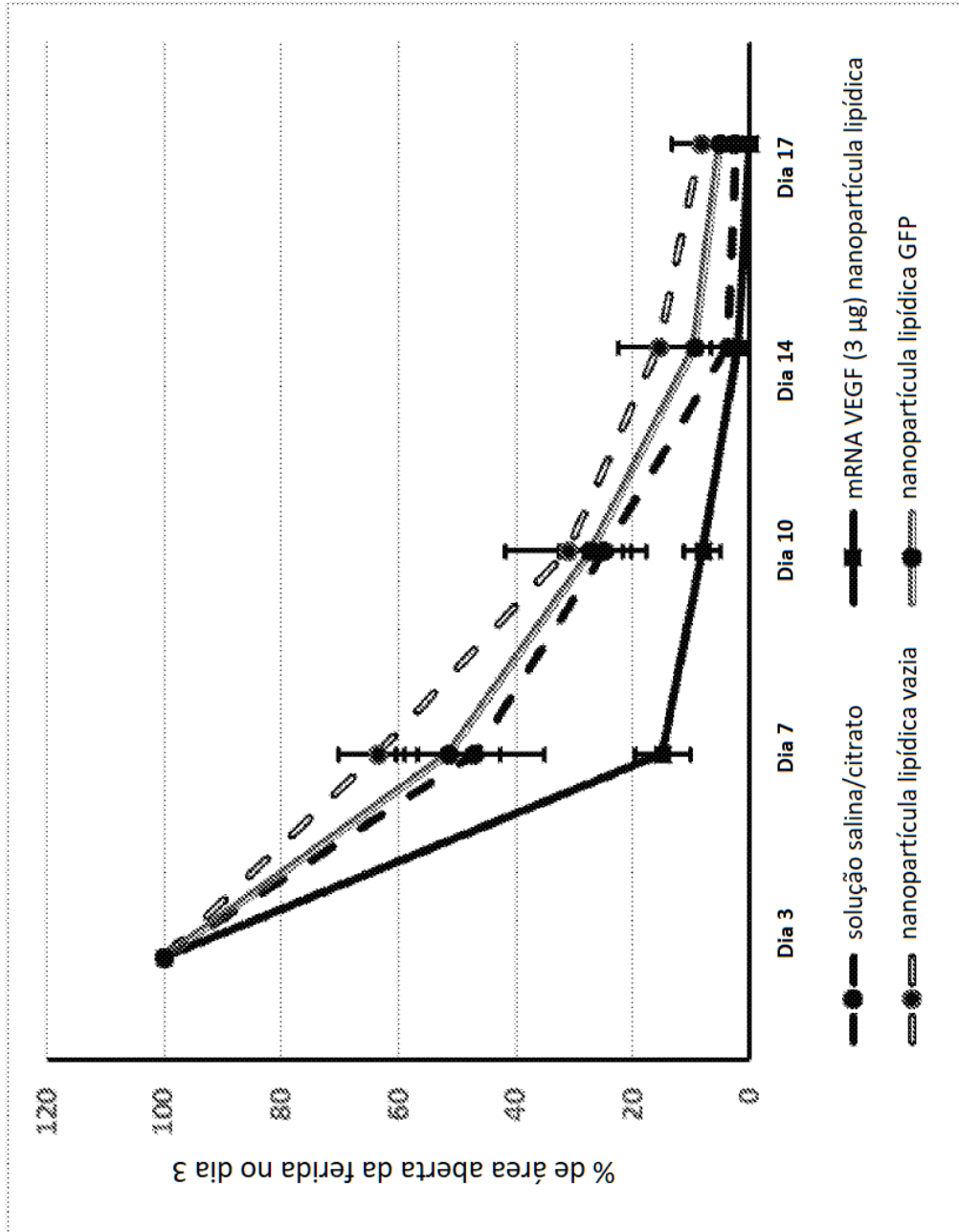
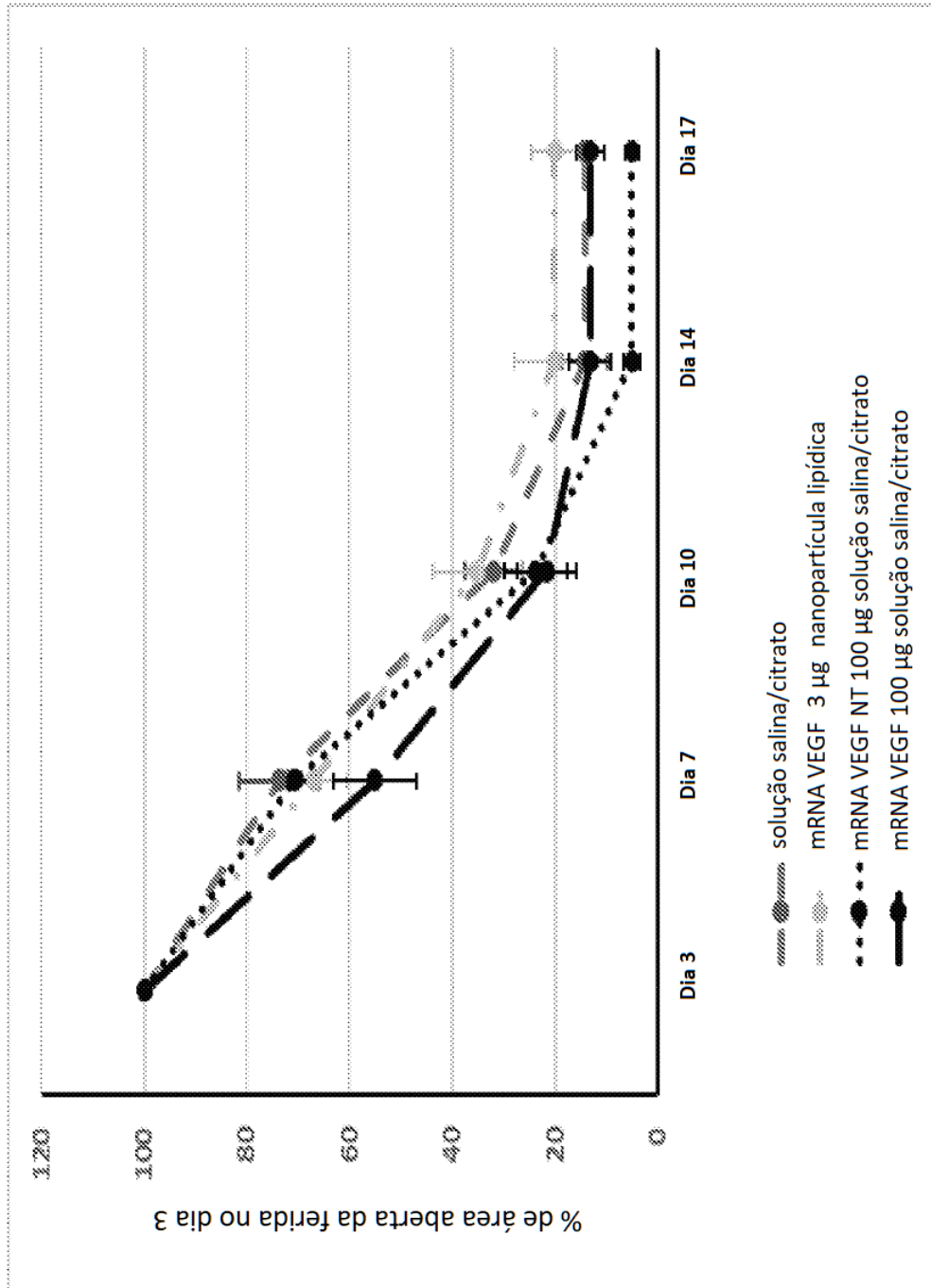


FIG. 8



RESUMO

Patente de Invenção: **“NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA A ENTREGA DE RNA MODIFICADO CODIFICANDO UM POLIPEPTÍDEO VEGF-A”**.

A presente invenção refere-se a nanopartículas compreendendo um componente lipídico e um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A. Aspectos da descrição referem-se ainda a usos de nanopartículas compreendendo um componente lipídico e um RNA modificado codificando um polipeptídeo VEGF-A para melhorar a cicatrização de feridas em um sujeito.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem de sequência p246812.TXT
- Data de Geração do Código: 28/04/2020
- Hora de Geração do Código: 12:57:01
- Código de Controle:
 - Campo 1: 34E29375EE571679
 - Campo 2: C114D9C3E3D12902